(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2005 005 284 T2** 2009.04.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 677 115 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2005 005 284.4**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **06 006 457.3**
(96) Europäischer Anmeldetag: **14.11.2005**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.07.2006**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.03.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.04.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 33/68*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
04027088 **15.11.2004** **EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(73) Patentinhaber:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

(72) Erfinder:
Eberle, Walter, 82347 Bernried, DE; Stock, Werner, 82166 Graefelfing, DE; Winter, Baerbel, 82327 Tutzing, DE

(54) Bezeichnung: **Prion-Assays mit hoher Durchlaufleistung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Prion-Tests, die post mortem aus Tieren oder Menschen entnommene Gehirnproben analysieren. Ein partiell automatisierter Hochdurchsatz-Arbeitsablauf ist eine erfindungsgemäße Ausführungsform. Eine bestimmte Ausführungsform betrifft die Synchronisation der Probenverarbeitung. Eine weitere Ausführungsform betrifft zeitsparende Verfahren bei der Analyse großer Zahlen von Proben und Maßnahmen zur Bewahrung eines hohen Maßes an Testgenauigkeit. Eine weitere Ausführungsform betrifft die Steigerung der Laborsicherheit bei der Verarbeitung großer Mengen an prioninfiziertem Probenmaterial. Zudem betrifft eine Ausführungsform einen Algorithmus zur Berechnung eines Ausschluss-Wertes, damit die Testergebnisse in bestimmte Klassen unterteilt werden.

[0002] Die Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) ist ein seltener und tödlicher neurodegenerativer Zustand beim Menschen. Wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wird vCJD aufgrund der charakteristischen schwammartigen Degeneration des Gehirns und seiner Fähigkeit zur Übertragung als übertragbare spongiforme Enzephalopathie (TSE) klassifiziert. vCJD ist eine neue Krankheit, die erstmals im März 1996 beschrieben wurde. vCJD betrifft im Gegensatz zu den herkömmlichen Formen von CJD jüngere Patienten (mittleres Alter 29 Jahre gegenüber 65 Jahren), hat eine relativ längere Krankheitsdauer (im Mittel 14 Monate im Gegensatz zu 4,5 Monaten) und ist stark mit der Einwirkung, möglicherweise durch Nahrungsmittel, einer TSE von Rind verknüpft, die man als spongiforme Encephalopathie beim Rind (BSE) bezeichnet. TSEs sind auch bei anderen Tieren bekannt. Scrapie befüllt beispielsweise Schafe und Ziegen und wird seit über 250 Jahren in vielen schafproduzierenden Ländern auf der ganzen Welt gefunden. Chronic Wasting Disease (CWD) ist eine ansteckende tödliche TSE bei Cerviden (Mitgliedern der Familie der Elche und Hirsche).

[0003] Die Hypothese einer Verknüpfung zwischen vCJD und BSE wurde erstmalig aufgrund der Verbindung dieser beiden TSEs an Zeit und Stelle aufgestellt. Ein neuerer Beweis, der eine Verbindung unterstützt, umfasst die Identifikation pathologischer Eigenschaften, die vCJD in Gehirnen von Makaken-Affen ähneln, die mit BSE beimpft wurden. Eine Verbindung zwischen vCJD und BSE wird weiter durch den Beweis unterstützt, dass vCJD mit einem Molekül-Marker assoziiert ist, der es von anderen Formen von CJD unterscheidet und der demjenigen ähnelt, der in BSE beobachtet wurde, welches auf eine Reihe andere Arten übertragen wird. Untersuchungen der Verteilung des Erregers in den Gehirnen von Mäusen, die künstlich mit Geweben aus Menschen mit vCJD und Kühen mit BSE infiziert wurden, zeigten nahezu identische Muster. Der neueste und stärkste Beweis stammt von Untersuchungen, die zeigen, dass die Übertragungseigenschaften von BSE und vCJD in Labormäusen nahezu identisch sind, was nachhaltig darauf hinweist, dass sie durch den gleichen Erreger verursacht werden. Zusammengefasst ist die wahrscheinlichste Ursache für vCJD eine Einwirkung des BSE-Erregers, und zwar am glaubhaftesten aufgrund einer Nahrungs-Verunreinigung durch befallenes Zentralnervensystem-Gewebe aus Rind.

[0004] Die Infektionserreger, die an TSE beteiligt sind, werden gewöhnlich als Prionen bezeichnet. Diese Pathogene sind durch ungewöhnlich Eigenschaften charakterisiert, und insbesondere durch ihre starke Resistenz gegenüber üblichen Desinfektionsverfahren, die gegen herkömmliche Mikroorganismen verwendet werden. Prionen, die in Vieh BSE und in Menschen vCJD verursachen, werden durch infizierte Nahrungsprodukte übertragen. Der Inkubationszeitraum der Krankheit ist zwar ziemlich lang, aber der Beginn der Symptome führt zu extremer neunlogischer Schwächung innerhalb von einigen wenigen Monaten. Alle Tiere besitzen normale Prionproteine, die durch eine Reihe von Akronymen in der wissenschaftlichen Literatur bekannt sind, beispielsweise PrP, oder PrPc. PrPc werden auf der Oberfläche vieler Zelltypen gefunden, einschließlich Nerven, Lymphocyten und Makrophagen Alle Proteine "falten" sich selbst zu spezifischen dreidimensionalen Formen. Gelegentlich werden normale Prionproteine anormal gefaltet. Dann können die anormalen Prionen normale Prionen durch physikalischen Kontakt "infizieren", wobei das anormal gefaltete Prion bewirkt, dass sich das normale ebenfalls falsch faltet, wodurch der Krankheitszustand verbreitet wird.

[0005] Eine Hauptkomponente stark infektiöser Prionproteinfraktionen ist ein Proteinase K resistentes Prionprotein, das als PrPsc bezeichnet wird. Das normale Wirts-Prionprotein PrPc ist gegenüber Proteinase K empfindlich. Das biochemische Verhalten von PrPsc unter denaturierenden Bedingungen und in der Anwesenheit von Proteinase K schafft eine biochemische Maßnahme zur Untersuchung der Anwesenheit von PrPsc in Gewebeproben, wodurch die TSE-Krankheit diagnostiziert wird. Die Identifikation infizierter Hoftiere, wie Rind oder Schaf, post mortem ist besonders wichtig, um zu verhindern, dass potentiell gefährliches Fleisch und andere Produkte in die menschliche Nahrungskette gelangen. Da die Zahl der in der Fleischindustrie geschlachteten und verarbeiteten Tiere hoch ist, müssen die von Nahrungsmittel-Überwachungszentren und Referenz-Labors durchgeführten TSE-Tests die Bedürfnisse der Hochdurchsatz-Untersuchung erfüllen.

[0006] Ein allgemeiner Arbeitsablauf zur Untersuchung auf TSE umfasst im Wesentlichen die folgenden Schritte: Entfernen des Probengewebe aus einem getöteten Tier. In dem beispielhaften Fall von BSE ist die Probe vorzugsweise ein Teil vom Gehirn; gewöhnlich wird ein Teil des Hirnstamms entfernt, wenn das Tier aufgeschnitten wird. Das Stück Gehirn umfasst vorzugsweise den Obex. Andere Gewebe sind jedoch möglich, umfassend Rückenmarksgewebe und ebenfalls Lymphknoten oder Mandelgewebe.

[0007] Man entnimmt eine definierte Menge Gewebe, das im Folgenden als "die Probe", "das entnommene Gewebe" oder "die Gewebeprobe" bezeichnet wird.

[0008] Die Gewebeprobe wird homogenisiert. Die homogenisierte Probe wird derart behandelt, dass sie sich, wenn zugegen, zum spezifischen Nachweis von PrPsc eignet. Eine bevorzugte Vorbehandlung verwendet eine proteolytische Spaltung der homogenisierten Probe mit Proteinase K und die Denaturierung mit einem chaotropen Mittel.

[0009] Die behandelte Probe wird mit einem oder mehreren spezifischen Bindemitteln inkubiert. Gewöhnlich ist ein Bindungsmittel ein Antikörper oder ein Antikörper-Fragment. Die Menge des Komplexes, der durch das oder die Bindungsmittel gebildet wird und des Analyten, wird so gemessen, dass man einen Messwert erhält. Wird eine Probe, die mit Proteinase K und chaotropem Mittel behandelt wird, analysiert, sind die Bindungsmittel spezifisch für ein Fragment von PrPsc, das der Proteinase K-Behandlung widersteht.

[0010] Zur Bezeichnung eines quantitativen Wertes für ein positives oder negatives Testergebnis wird ein Algorithmus verwendet, der Referenzdaten und/oder Messwerte berücksichtigt, die in ein oder mehreren Kontrollexperimenten erzeugt wurden.

[0011] Die vorliegende Erfindung konzentriert sich auf die Schritte (3), (4), (5) und (6) des Arbeitsablaufs. Der erfindungsgemäße Schritt (5) umfasst die Vorbehandlung mit einem proteolytischen Enzym und einem chaotropen Mittel.

[0012] In Bezug auf kommerzialisierte Testsysteme existieren mehrere Wege zur Durchführung der Schritte 3 bis 6. In der Regel erfordert die Verarbeitung des infektiösen Gewebes oft komplexe Ausrüstung, damit die Bedürfnisse der Laborsicherheit einerseits und die technischen Anforderungen andererseits erfüllt werden.

[0013] Ein erstes von Prionics AG (Schlieren, Schweiz) entwickeltes Testsystems wird unter dem handelsüblichen Namen Prionics®-Check WESTERN und Prionics®-Check LIA (Lumineszenz-Immuntest, weiter unten beschrieben) geliefert. Das Prionics®-Check-LIA-Testsystem umfasst (i) Homogenisierung von Probengewebe mit einer komplexen Vorrichtung und Gerät, (ii) proteolytische Probenbehandlung und (iii) immunologischen Nachweis von PrPsc, wobei die Schritte (ii) und (iii) im Format mit 96 Vertiefungen durchgeführt werden.

[0014] Gemäß dem Benutzerhandbuch des Testsystems wird für den Homogenisierungsschritt eine Dekonstitutions-Vorrichtung für die Herstellung biologischer Proben, wie in WO 02/48679 beschrieben, verwendet. Die Vorrichtung umfasst einen Behälter in der Form einer Schale zum Halten des zu dekonstituierenden Gewebes. Eine Welle ist zur Drehung im Inneren des Behälters mit einer Klinge am Ende im Inneren des Behälters befestigt. Die Welle ist axial durch Kugelkopf-Einrichtungen gelagert und hat Eingriff-Vorrichtungen auf ihrem Ende außerhalb des Behälters zur Kopplung der Welle an einen Motor. Die Vorrichtung wird in einer Automatik-Vorrichtung (FASTH) PCPM4, Co. 80040, Consul AR, Villeneuve, Schweiz) verwendet, welche umfasst: mindestens ein Lagerbauteil mit einer Anzahl von Gehäusen zur Aufnahme des Behälters; eine Dekonstitutionsstation, umfassend mindestens einen Motor mit einer Antriebswelle zum Festhalten der Eingreifvorrichtung der Welle der Dekonstitutionsvorrichtung, wodurch sich der Motor bewegen lässt zwischen einer Position, die von der Welle gelöst ist und einer Position, die in diese eingreift, und Beförderungs-Einrichtungen zum Transport des Lagerbauteils zur Dekonstitutions-Station. Die FASTH-Vorrichtung verarbeitet zeitgleich 4 Behälter, die sich in einem Ständer befinden. Der Ständer fasst 8 Behälter, die in zwei aufeinander folgenden Schritten verarbeitet werden. Eine weitere Vorrichtung (MEDIFASTH, Consul) ist im Handel erhältlich und arbeitet ähnlich, verarbeitet aber nur zwei Behälter auf einmal. Die Behälter sind in Ständern untergebracht, wobei jeder Ständer bis zu zwei Behälter fasst.

[0015] Die Behälter sind im Handel erhältlich als Einwegstände (PRYPCONS®, Consul AR, Villeneuve, Schweiz) aus Kunststoff. Jeder Behälter hat einen Gleitverschluss im Deckel, durch den das entnommene Hirngewebe in den Behälter überführt wird. Die FASTH-Vorrichtung kann 6 Ständer, d. h. 48 Behälter, aufnehmen und nacheinander verarbeiten. Ständer mit verarbeiteten Behältern können aus der laufenden Vorrichtung entnommen werden; entsprechend kann die Vorrichtung mit neuen Ständern beladen werden. Gemäß dem

Hersteller kann die Vorrichtung bis zu 250 Proben/Std. homogenisieren.

[0016] In jedem Behälter wird eine Probe von 350–700 mg Gewebe zusammen mit dem zehnfachen Volumen Homogenisierungspuffer homogenisiert. Damit ein korrektes Verhältnis von Probe zu Puffer gewährleistet wurde, wird das Gewicht des Probengewebes vorher bestimmt. Nach dem Homogenisierungsverfahren wird ein Aliquot des Homogenats (1 ml) manuell aus dem Behälter entnommen, gewöhnlich mit einer Handpipette mit Wegwerf-Pipettenspitzen, und wird in eine "Proben-Master-Platte" mit 96 Vertiefungen überführt. Alternativ kann das Homogenat mit einer Automatik-Pipettenvorrichtung (beispielsweise geliefert von der TECAN Gruppe Ltd. Ltd., Schweiz) entnommen und überführt werden. Die Schiebeöffnung jedes Behälters muss jedoch manuell geöffnet werden.

[0017] In einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte (der "Spaltungs"-Platte) wird ein Volumen von 100 µl Homogenat mit 50 µl Spaltungslösung gemischt, das eine Protease enthält. Das Gemisch wird dann verschlossen und inkubiert. Nach einer Inkubation werden 10 µl einer Stopplösung zu dem gespaltenem Homogenat gegeben und gemischt. Ein Volumen von 15 µl Gemisch wird in einen Hohlraum von einer anderen Mikrotiterplatte (der "Vorinkubations"-Platte") gegeben, die 15 µl eines "Testpuffers" enthält. Das Überführen und Mischen der Probe müssen in 2 bis 5 min beendet sein. Nach 2 bis 5 min wird ein Volumen von 10 µl "Vorinkubationspuffer" zugegeben und für etwa 2 min inkubiert. Anschließend werden 200 µl "Nachweisantikörper-Lösung" zugegeben und gemischt. Die Platte wird verschlossen und auf einem Schüttler für etwa 60 min inkubiert. Anschließend wird ein Volumen von 200 µl jeder Vertiefung in die entsprechende Vertiefung einer "Fangplatte" überführt. Die Platte wird dann etwa 90 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird die Fangplatte viermal mit Waschpuffer gewaschen, wobei ein ELISA-Wäscher verwendet wird. Restliche Flüssigkeit wird entfernt (vorzugsweise durch Klatschen) und jeder Hohlraum wird mit 100 µl einer chemilumineszenten Substratarbeitslösung gefüllt. Nach einem Inkubationszeitraum von 5 bis 10 min werden die Lichtsignale in einem Chemiluminometer gelesen, und die Signale werden aufgezeichnet.

[0018] Ein anderes Testsystem ist das Enfer-TSE-Diagnose-Kit, das von (Abbott Laboratories, USA) verkauft wird. Das Homogenisierungsverfahren hängt vom Stomacher®-Gerät (Seward Stomacher 80) ab. Die Vorrichtung wirkt mechanisch, wobei Profilschaufeln einen Druck auf einen Probenbeutel ausüben. Das Probengewebe in dem Probenbeutel wird in der Anwesenheit von Probenpuffer homogenisiert. Dieses Verfahren ist für weiches Gewebe, wie Obex, geeignet. Eine einzelne Vorrichtung kann 2 Beutel auf einmal verarbeiten. Die Homogenisation einer Gewebeprobe dauert gewöhnlich 2 min. Für jedes einzelne Probenpräparat müssen eine neue Klinge, Zungendepressor, Wiegeschiffchen und Homogenisatorbeutel verwendet werden, damit eine Kreuzkontamination verhindert wird. Das Probengewebe ist ein dünner Querschnitt von ZNS-Gewebe mit einem Gewicht zwischen mindestens 0,5 g und 1,0 g. Das Wiegen und Überführen der Probe in den Beutel erfordert ausgiebige Handarbeitsschritte. Je 1 g Gewebe werden 15 ml Probenpuffer in den Beutel gegeben. Beim Verteilen des Probenpuffer muss man den Kontakt des Dispensers mit dem Beutel sorgfältig vermeiden. Die Homogenisation wird durch optische Begutachtung kontrolliert. Nach dem Homogenisierungsschritt wird der Beutel zwischen 5 min und 40 min liegen gelassen, damit die Blasen nachlassen.

[0019] Nach dem Homogenisierungsverfahren wird der Homogenisierungsbeutel geöffnet und ein Aliquot (180 µl) des flüssigen Homogenates wird aus dem Beutel mit einer Handpipette mittels Wegwerfpipettenspitzen manuell entnommen. Zu diesem Zeitpunkt muss man sorgfältig darauf achten, dass die Pipette außen nicht durch Material aus dem Homogenisatorbeutel kontaminiert wird. Das Homogenat wird in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen überführt. Die Platte wird verschlossen und bei 4000 × g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wird dann in eine zweite Mikrotiterplatte mit 20 µl einer Proteinase K-Lösung überführt. Gemäß dem Benutzerhandbuch neigt die Proteinase-K-Lösung zum Kleben an den Seiten der Vertiefungen. Dies wird verhindert, indem der Puffer ganz unten in die Zellen pipettiert wird. Beim Überführen des Überstandes muss man sorgfältig darauf achten, dass das Pellet nicht aufgewirbelt wird, da eine Übertragung fester Teilchen verhindert werden muss. Die Platte wird dann mit einem Plattenverschluss verschlossen, und die Proben werden dann für 60 min auf einem Schüttler inkubiert. Während dieses Schritts werden die PrPsc-Aggregate hydrophob an die Hohlräume der Mikrotiterplatte gebunden, während die Proteinase K das PrPsc spaltet, so dass eine Unterscheidung zwischen PrPsc und PrPc gewährleistet ist. Die Pipettierschritte dieses Protokolls können automatisch erfolgen.

[0020] Die Hohlräume der Mikrotiterplatte werden gewaschen, und die Platte wird abgeklatscht, so dass die verbleibende Flüssigkeit entfernt wird. Anschließend werden die Proben-Vertiefungen mit 150 µl Enfer-Puffer 3 für 15 min inkubiert. Die Platte wird wieder gewaschen, abgeklatscht und danach wird polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der spezifisch für das PrP-Protein ist, in einem Volumen von 150 µl in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wird wieder verschlossen und für 40 min inkubiert: Danach werden die Vertiefungen wieder ge-

waschen und dann mit einem Enzym-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Konjugat werden die Vertiefungen gewaschen, und das chemilumineszente Substrat wird zugegeben. Das Lichtsignal wird in einem Chemiluminometer gelesen und das Signal aufgezeichnet.

[0021] Ein im Handel erhältliches Testsystem ist der TeSeE® BSE-Test, verteilt durch Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland, Katalognummern 3551144 [Reinigungs-Kit], 3551145 [Nachweis-Kit] 3551120 [Kalibrierungsspritze und Nadel]. Dieses Verfahren ist an die auf einmal erfolgende Verarbeitung von zweimal 45 Proben (plus Kontrollen) angepasst, wodurch zu Beginn Teströhrchen in den Ständern im 6 * 8 Format verwendet werden.

[0022] Eine Menge von 350 µg ± 40 µg Hirnstammgewebe, vorzugsweise Obex-Gewebe, wird in ein Mahlrohr überführt. Dies ist ein Testgefäß mit einem Volumen von etwa 2 ml, das etwa 1,5 ml Homogenisierungspufer und Mahlkügelchen enthält. Die mit Kügelchen und Puffer vorgefüllten Gefäße sind Teil des BioRad-Kits. Die Mahlkügelchen haben einen Durchmesser zwischen 0,5 mm und 1 mm. Das Röhrchen wird mit Mahlperlen bis etwa zur 200 µl Markierung gefüllt. Beim Überführen von Probengewebe wird jedes Testgefäß manuell mit einem Schraubdeckel verschlossen und das Gefäß wird in einem Ständer untergebracht, der insgesamt 48 Gefäße fasst. Der Homogenisierungsschritt erfolgt mit einer RIBOLYSER®- oder einer TeSeE®-Precess 48®-Vorrichtung. Im Grunde bewegt die Vorrichtung die Ständer mit den Gefäßen, und die Bewegung der Perlen in jedem Gefäß homogenisiert die darin enthaltenen Probengewebe.

[0023] Nach dem Homogenisierungsschritt wird der Ständer aus der Schüttelvorrichtung entfernt, wobei jedes Gefäß manuell geöffnet wird, und ein Volumen von 250 µl des Homogenats wird mit einer Einweg-Spritze entnommen, die mit einer kalibrierten stumpfen Nadel ausgestattet ist. Die Nadel muss in das Kügelchen-Pellet eingetaucht werden, damit keine schlecht homogenisierten Gewebefragmente aufgenommen werden.

[0024] Die Homogenate werden zur weiteren Behandlung in die Reaktionsgefäße überführt. Ein gleiches Volumen von Proteinase-K-Lösung wird zugegeben, gemischt und bei 37°C für 10 min inkubiert. Das Mischen erfolgt manuell durch 10-maliges Umkippen der Röhrchen. Gemäß dem Benutzerhandbuch darf die Zeit zwischen der Zugabe der Proteinase-K-Lösung und der Inkubation bei 37°C 2 min nicht überschreiten. Nach der Inkubation wird ein Volumen von 250 µl einer "Klärungslösung" (Reagens B) zugegeben und gemischt. Man beachte, dass für diesen Schritt das Eppendorf-Gefäß manuell geöffnet und wieder verschlossen werden muss. Man beachte auch, dass gemäß dem Benutzerhandbuch die Zeit nach der Inkubation bis zu dem Zeitpunkt, wenn die Klärungslösung gemischt wird, 2 min nicht überschreiten darf. Innerhalb von 30 min werden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 5 min bei 20000 × g zentrifugiert. Die Gefäße werden wieder geöffnet und die Überstände verworfen. Die Gefäße werden durch Umwenden auf saugfähiges Papier für 5 min getrocknet. Anschließend wird ein Volumen von 25 µl "Auflösepuffer" (Reagens C) in jedes Gefäß gegeben, das Gefäß wird wieder verschlossen und dann sofort für 5 min bei 100°C inkubiert. Danach werden in einem weiteren manuellen Schritt die Gefäße 5 sec auf einem Vortex-Mischer aufgewirbelt.

[0025] Die behandelte Probe wird dann mit 125 µl PBS verdünnt, das BSA enthält, und unmittelbar vor der Überführung in eine Mikrotiterplatte durch Vortexen gemischt. 1,00 µl der verdünnten Probe wird auf die Mikrotiterplatte überführt, die mit einem monoklonalen Fang-Antikörper beschichtet ist. Die Platte wird mit einem Klebeband verschlossen. Nach der Inkubation der Platte für etwa 75 min bei 37°C wird die Platte mit einem Automatik-Wäscher gewaschen und anschließend werden 100 µl einer Lösung, die einen enzymkonjugierten Nachweis-Antikörper enthält, in jede Vertiefung gefügt. Die Platte wird wieder mit einem Klebeband verschlossen. Nach der Inkubation der Platte für etwa 1 Std. wird die Platte wieder gewaschen und ein Volumen von 100 µl einer Substrat-Lösung wird in jede Vertiefung gegeben. Nach 30 min wird die Enzymreaktion durch Zugabe einer Stopp-Lösung gestoppt. Die Signale werden in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gelesen, und die Signale werden aufgezeichnet.

[0026] Die Verfahren des Standes der Technik haben bestimmte Nachteile. Insbesondere das Homogenisierungsverfahren veranschaulicht einen Engpass in Bezug auf die Empfänglichkeit gegenüber Kontamination und Probendurchsatz. Man beachte, dass ein Testsystem, das durchweg in dem standardisierten 8·12 (d. h. mit 96) Format durchgeführt wird, vorteilhaft ist. Auch ein kosteneffizienter Arbeitsablauf in diesem Format mit reduzierten Arbeitszeiten-Zeiten ist gewünscht.

[0027] Für den PRYPCON-Behälter beachte man, dass das Gewebe in dem Behälter in Anwesenheit von Homogenisierungspuffer mittels schnell rotierenden (20000 U/min) Schaufeln homogenisiert wird. Demnach werden aerosolhaltige Komponenten von möglicherweise prioninfiziertem Gehirngewebe im Luftraum im Inneren Kompartiment des Behälters erzeugt. In Bezug auf den Behälter beachte man zudem, dass sowohl (i) die Öff-

nung des Deckels mit der eingeführten Welle als auch (ii) die Schiebeöffnung keinen vollständig luftdichten (d. h. druckdichten) Verschluss für das innere Kompartiment liefern, wo die Homogenisierung erfolgt. Die zur Homogenisierung mit dem Stomacher®-Gerät verwendeten Probenbeutel können ebenfalls Kontamination verursachen, wenn das Homogenat aus dem Beutel entfernt wird.

[0028] In Bezug auf den Durchsatz kann die FASTH-Vorrichtung zeitgleich 4 PRYPCON-Behälter verarbeiten.

[0029] Dieses System schafft zwar ein teilweise automatisiertes Homogenisierungsverfahren, das alternative System mit den Stomacher®-Beuteln kann nur 2 Beutel auf einmal pro Vorrichtung verarbeiten. Das Bio-Rad-System hingegen homogenisiert 48 Proben zugleich.

[0030] Während des Probenpräparationsverfahrens des BioRad-Systems wird jedes Mahlröhrchen manuell mit einem Schraubverschluss verschlossen. Das Drehen des Schraubdeckels presst eine Dichtung auf die Öffnung des Behälters; je stärker der Schraubdeckel gedreht wird, desto dichter ist das Röhrchen verschlossen. D. h. je nach der ausgeübten Kraft beim Drehen des Deckels zum Schließen des Gefäßes kann der Schließeffekt des Schraubdeckels unvollständig sein. Als Folge einer unzureichenden Dichtung kann Flüssigkeit aus dem Gefäß aus dem mit Schraubdeckel verschlossenen Gefäß entweichen, beispielsweise wenn der Druck im Inneren des Gefäßes gegenüber Außen aufgrund eines Anstiegs der Temperatur des Gefäßes oder eines Abfalls des Luftdrucks außen steigt. Somit wird die Verwendung von Schraubdeckeln zu einem Problem, wenn das "Abdichten" als ein definierter (d. h. standardisierter Zustand) oder als Ergebnis erhalten werden soll. Ein beispielhafter Parameter für standardisiertes Abdichten ist eine Luftdichtheit über ein definiertes Zeitintervall gegen eine gemessene relative Differenz zwischen einem höheren Luftdruck in dem Behälter und einem niedrigeren Luftdruck außerhalb des verschlossenen Behälters.

[0031] Zudem erfordert die Verwendung von Schraubdeckeln eine gesteigerte manuelle Handhabung durch Labor-Techniker und verhindert eine rasche Verarbeitung. Folglich schaffen Schraubdeckel ein Problem, wenn eine größere Menge an Gefäßen geöffnet und geschlossen werden muss oder wenn man die Gefäße automatisch schließen möchte. Je mehr manuelle Arbeitsschritte beteiligt sind, desto höher ist zudem die Wahrscheinlichkeit, dass Gefäße mit Probenmaterial versehentlich verwechselt werden.

[0032] Die Menge und die Komplexität des Materials für einen einzelnen Gebrauch, der zur Durchführung eines TSE-Tests benötigt wird, beeinflussen den Preis eines Testsystems. Die Menge von Einweggegenständen und dem Material, aus dem diese hergestellt sind, beeinflussen besonders die Kosten der Abfallentsorgung. Je nach den nationalen Vorschriften muss jedes Abfallmaterial, das mit einem infektiösem TSE-Erreger zusammengekommen war, einer chemischen und/oder Wärmebehandlung, Autoklavierung oder Verbrennung unterworfen werden. Aufgrund der Schwierigkeiten zur Inaktivierung infektiöser Prionen sind diese Verfahren teurer als die Inaktivierung von gewöhnlichem infektiösem Abfall. Daher möchte man den Aufwand bei der Abfallentsorgung beim Durchführen von TSE-Tests im Hochdurchsatz minimieren.

[0033] Angesichts des Standes der Technik ist das erfindungsgemäß zu lösende Problem die Bereitstellung eines Prion-Testsystems, das sämtliche Arbeitsschritte einschließlich der Probenpräparation, Probenbehandlung und Immunometrischen Analyse in einem einzelnen standardisierten Format integriert, mit einer verringerten Belastung durch manuelle Arbeitsschritte. Ein weiteres zu lösendes Problem ist die Bereitstellung eines Prion-Testsystems, das die Zeit bis zur Erzeugung des Endergebnisses verkürzt. Gleichzeitig möchte man, dass ein Hochdurchsatz-Testsystem zum Prion-Nachweis robust und verlässlich ist und dass der Arbeitsablauf die Gefahren minimiert, während potentiell infektiöses Material verarbeitet wird. Zudem möchte man das Testsystem so gestalten, dass die Wahrscheinlichkeiten, dass Proben und/oder Testgefäße verwechselt werden, minimiert werden. Ein weiteres zu lösendes Problem ist die Bereitstellung eines Testsystems, das mit den Komponenten für den Einmalgebrauch wirtschaftlich umgeht und nur eine minimale Menge an kontaminiertem oder potentiell infektiösem Abfallmaterial erzeugt.

[0034] Erfindungsgemäß wird das Problem gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Durchführung eines Hochdurchsatztests zur Bestimmung des Vorliegens von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wobei der Test den Arbeitsablauf von (A) Probenherstellung, (B) Probenbehandlung, (C) Probenanalyse, (D) Kontrollen und (E) Klassifizierung der Ergebnisse der Analyse als positiv oder negativ umfasst,

wobei (A) folgende Schritte umfasst

(a) Bereitstellen, in einem standardisierten Format, eines Ständers mit einem Satz einzeln beschrifteter Behälter, wobei der Behältersatz eine Untergruppe für Kontrollreaktionen (Kontrollbehälter), die wie in (D) vor-

gesehen verarbeitet werden, und eine Untergruppe von Behältern für die Probenanalyse oder Analysebehälter umfasst,
(b) Bereitstellen in jedem Analysebehälter
(i) von 3 bis 6 kugelförmigen Perlen, wobei jede Perle zwischen 50 mg und 100 mg wiegt, und
(ii) eines Volumens an Homogenisierungspuffer, wobei der Homogenisierungspuffer ein proteolytisches Enzym enthält, das in Gegenwart eines chaotropen Mittels eine Proteolyse ausführen kann;
(d) Bereitstellen einer Gewebeprobe aus Gehirn, wobei die Gewebeprobe durch ein Etikett identifiziert wird, das einzigartige Informationen enthält, welche den Ursprung der Gewebeprobe definieren;
(e) Durchführen der Schritte
(i) Aufzeichnen des Etiketts der Gewebeprobe,
(ii) Überführen der Gewebeprobe in einen Analysebehälter,
(iii) Aufzeichnen des Etiketts des Analysebehälters,
(iv) Korrelieren der in Schritt (i) aufgezeichneten Informationen mit den im Schritt (iii) aufgezeichneten Informationen,
(v) Wiederholen der Schritte (i), (ii), (iii) und (iv), bis die gewünschte Menge an Analysebehältern in dem Ständer mit Probengewebe gefüllt ist;
(f) Durchführen der Schritte
(i) Verschließen der Behälter des Ständers mit Verschlussvorrichtungen, gefolgt von
(ii) Schütteln des Ständers mit den Behältern unter Verwendung einer Schüttelvorrichtung, wobei das Schütteln die Perlen vom Boden an die Oberseite jedes Analysebehälters bewegt, wodurch das Probengewebe darin homogenisiert wird, gefolgt von
(iii) Sedimentieren von Gewebetrümmern in den Analysebehältern, gefolgt von
(iv) Öffnen der Behälter und Absaugen eines Aliquots des Überstandes aus jedem Behälter,

wobei (B) nach (A) durchgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen einer Mikrotiterplatte, wobei jede Vertiefung als Trockensubstanz eine festgelegte Menge eines chaotropen Mittels enthält (konditionierte Mikrotiterplatte), wobei das chaotrope Mittel an die Wand der Vertiefung gebunden ist, gefolgt von
(b) Überführen der Überstände von (A) Schritt (f) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, wobei das überführte Volumen derart gewählt wird, dass das Auflösen der Trockensubstanz in jeder Vertiefung zu einer Konzentration zwischen 300 mM und 2 M des chaotropen Mittels im Überstand führt, gefolgt von
(c) Lösen des chaotropen Mittels, gefolgt von
(d) Inkubieren der Mikrotiterplatte bei einer Temperatur zwischen 15°C und 50°C, wodurch die Proteolyse ermöglicht wird, gefolgt von
(e) Inhibieren der Aktivität des proteolytischen Enzyms, gefolgt von
(f) Erhöhen der Konzentration des chaotropen Mittels in dem Gemisch in jeder Vertiefung auf einen Wert zwischen 3,5 M und 5 M, gefolgt von
(g) Inkubieren der Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur, wobei die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden, wodurch behandelte Proben bereitgestellt werden,

wobei (C) nach (B) ausgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen einer Mikrotiterplatte, die mit Streptavidin beschichtet ist (Nachweis-Mikrotiterplatte),
(b) Überführen eines Aliquots von jeder behandelten Probe von (B) Schritt (f) in eine Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, gefolgt von
(c) Zugeben eines drei- bis zehnfachen Volumens einer Nachweislösung zu dem Aliquot, die ein erstes und zweites Bindungsmittel enthält, das für zwei getrennte Epitope von entfaltetem PrP(27–30) spezifisch ist, wobei das erste spezifische Bindungsmittel biotinyliert ist und das zweite spezifische Bindungsmittel mit einem Reporterenzym konjugiert ist, gefolgt von
(d) Inkubieren der Nachweis-Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln, wodurch die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden und man Komplexe aus den spezifischen Bindungsmitteln und entfaltetem PrP(27–30) bilden lässt, gefolgt von
(e) Entfernen der Flüssigkeit aus den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer, gefolgt von
(f) Zugeben von Reporterenzym-Substratlösung zu den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Inkubieren der Platte, gefolgt von
(g) Durchführen der Schritte
(i) Messen des Umsatzes des Substrates in der Vertiefung als optische Dichte (OD), wodurch ein Messwert für die Vertiefung bereitgestellt wird, gefolgt von
(ii) Aufzeichnen des Messwertes, wobei eine Überablesung als OD = 4,0 aufgezeichnet wird,
(iii) Korrelieren des aufgezeichneten Messwertes von (ii) mit den Informationen, die für die entsprechende

Gewebeprobe in (A) Schritt (e) Schritt (i) aufgezeichnet wurden,
(iv) Wiederholen der Schritte (i) bis (iii), bis die Messwerte im Hinblick auf alle Gewebeproben verarbeitet worden sind, wodurch Analysedaten in Bezug auf die Proben erhalten werden,

wobei (D) folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen eines Reagens, das ein rekombinant hergestelltes, lösliches Fusionsprotein enthält, das die Aminosäuresequenzen von (i) einem oder mehreren löslichen Trägerpolypeptiden, (ii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das erste spezifische Bindungsmittel abzielt, und (iii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das zweite spezifische Bindungsmittel abzielt, umfasst,
(b) vor der Durchführung der Schritte (A) Schritt (f) und des anschließenden Arbeitsablaufs Durchführen der folgenden Schritte
(i) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer ersten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von
(ii) Bereitstellen eines Aliquots des Homogenisierungspuffers von (A) Schritt (b) Schritt (i) in der ersten Menge an Kontrollbehältern, wodurch negative Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(iii) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (i) mit den negativen Kontrollen,
(iv) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer zweiten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von
(v) Bereitstellen in der zweiten Menge an Kontrollbehältern, eines Aliquots einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Homogenisierungspuffer ohne das proteolytische Enzym und Homogenisierungspuffer, der zusätzlich eine wirksame Menge eines Proteaseinhibitors enthält, wodurch positive Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(vi) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (iv) mit den positiven Kontrollen, gefolgt von
(vii) Abgeben einer abgemessenen Menge an Kontrollreagens in jeden Kontrollbehälter,
(viii) Einschließen der positiven und negativen Kontrollen in (A) Schritt (f), (B) und (C) Schritte (a) bis (f),
(c) Durchführen der folgenden Schritte
(i) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine negative Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle negativen Kontrollen verarbeitet worden sind,
(ii) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (i) mit den für die negativen Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch negative Kontrolldaten erhalten werden,
(iii) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine positive Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle positiven Kontrollen verarbeitet worden sind,
(iv) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (iii) mit den für die positiven Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch positive Kontrolldaten erhalten werden,

wobei (E) nach (A), (B), (C) und (D) durchgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der positiven Kontrolldaten [M(p)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,
(b) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der negativen Kontrolldaten [M(n)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,
(c) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der Analysedaten [M(a)], die von (C) Schritt (d) geliefert werden,
(d) Berechnen eines Ausschlusswertes,
(e) Vergleichen des Messwertes einer Gewebeprobe, der von (C) Schritt (d) geliefert wird, mit dem Ausschlusswert von (d), gefolgt von
(f) Durchführen der Schritte
(i) Klassifizieren des Messwertes als positives Testergebnis, wenn der Messwert gleich oder größer als der Ausschlusswert ist, oder
(ii) Klassifizieren des Messwertes als negatives Testergebnis, wenn der Messwert kleiner als der Ausschlusswert ist, gefolgt von
(iii) Aufzeichnen des Testergebnisses und Korrelieren des Testergebnisses mit den Informationen, die für die entsprechende Gewebeprobe aufgezeichnet wurden, gefolgt von
(iv) Zuweisen des Testergebnisses zu der entsprechenden Gewebeprobe,
(g) Wiederholen der Schritte (e) und (f), bis die Messwerte aller Gewebeproben verarbeitet worden sind.

[0035] Die Erfindung stellt zudem ein Protein der Formel S-L1-S-L2-hPrP-His-tag bereit, wobei S die E. coli SlyD Chaperon Aminosäuresequenz SEQ ID NR: oder ein Fragment davon ist, L1 und L2 eine erste und zweite glycinreiche Linker-Aminosäuresequenz sind, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein Aminosäurese-

quenz nach SEQ ID NR: 3 ist, und His-tag eine Histidin-tag-Sequenz ist. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins bereit, sowie ein Kit, das dieses enthält.

[0036] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Beschichtung der Wand der Vertiefung mit einem chaotropen Mittel, umfassend die Schritte (i) Lösen einer ersten Menge des chaotropen Mittels und einer zweiten Menge einer wasserlöslichen Helfersubstanz in Wasser; (ii) Überführen einer Menge der Lösung von Schritt (i) in die Vertiefung; (iii) Verdampfen des Lösungsmittels, wodurch ein Gemisch des chaotropen Mittels und der Helfersubstanz an der Wand der Vertiefung binden. Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist eine konditionierte Mikrotiterplatte, umfassend eine Anzahl von Vertiefungen, dadurch gekennzeichnet, dass die Wände der einen oder mehreren Vertiefungen mit einem Gemisch aus einem wasserlöslichen Kohlenhydrat und einem chaotropen Mittel bestehen. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine konditionierte Mikrotiterplatte, erhältlich durch die Schritte: Bereitstellen einer Mikrotiterplatte; (i) Lösen einer ersten Menge des chaotropen Mittels und einer zweiten Menge einer wasserlöslichen Helfersubstanz in Wasser; (ii) Überführen einer Menge der Lösung von Schritt (ii) in eine oder mehrere Vertiefungen der Mikrotiterplatte; (iii) Verdampfen des Lösungsmittels, wodurch ein Gemisch des chaotropen Mittels und der Helfersubstanz an die Wand der einen oder mehreren Vertiefungen gebunden wird. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen konditionierten Mikrotiterplatte zur Durchführung eines Tests zur Bestimmung des Vorliegens oder der Menge von PrPsc in einer biologischen Probe. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Teile-Kit, das einen verschlossenen Beutel aus einem wasserdichten Material umfasst und das eine erfindungsgemäße konditionierte Mikrotiterplatte enthält.

[0037] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung eines peptidischen Trypsininhibitors zur Hemmung der proteolytischen Aktivität der Proteinase K. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Zusammensetzung, die Wasser, Proteinase K und einen peptidischen Trypsininhibitor umfasst. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Hemmung der proteolytischen Aktivität von Proteinase K in einer wässrigen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass ein peptidischer Trypsininhibitor zur Zusammensetzung bei einer Konzentration zwischen dem 50- und 150-fachen der molaren Konzentration der Proteinase K zugegeben wird. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer behandelten biologischen Probe, von der angenommen wird, dass sie PrPsc enthält, so dass sie für einen spezifischen Nachweis von PrPsc geeignet ist. Das Verfahren umfasst sofern zugegen die Schritte (a) Homogenisieren der Probe; gefolgt von (b) proteolytischem Spalten der Probe durch Zugabe des Homogenats Proteinase K und Inkubieren der Probe; gefolgt von (c) Zugabe eines peptidischen Protease-Inhibitors zu dem inkubierten Gemisch von Schritt (b), wodurch eine behandelte biologische Probe erhalten wird, die sich für einen spezifischen Nachweis von PrPsc, sofern zugegen, eignet.

[0038] Die Erfindung wird durch einen Test zum Nachweis von BSE-infiziertem Rind veranschaulicht. Die bevorzugten monoklonalen Antikörper, die in den erfindungsgemäßen Tests verwendet werden, sind ebenfalls mit einer Prionproteinspezies von Hamster, Maus, Schaf, und Mensch reaktiv. Alternativ sind monoklonale Antikörper, die für ein Prionprotein gegen die aufgeführte Spezies spezifisch sind, bevorzugt. Daher gilt das allgemeine Verfahren gleichermaßen auch für andere TSE-Tests. Alternativ können andere Antikörper, die an den TSE-Analyten binden können, bereitgestellt werden, damit man einen erfindungsgemäßen Test durchführt.

[0039] Bestimmte Ausdrücke werden mit einer bestimmten Ausführungsform verwendet oder sind erstmalig in dieser Beschreibung der vorliegenden Erfindung definiert. Für erfindungsgemäße Zwecke sind die folgenden Begriffe durch ihre im Fachgebiet akzeptierten Definitionen definiert, wenn solche existieren, außer wenn diese Definitionen die nachstehend aufgeführten Definitionen beeinträchtigen oder partiell beeinträchtigen. Im Falle einer Beeinträchtigung der Definition wird die Bedeutung der Begriffe erstmalig durch die nachstehend aufgeführten Definitionen definiert.

[0040] Der Begriff "umfassend" bedeutet "einschließlich, aber nicht notwendigerweise darauf eingeschränkt". Es versteht sich zudem, dass der Begriff "etwa" in Kombination mit einem numerischen Wert n einen Wert x in dem Interval angibt, das durch den numerischen Wert ± 5% des Wertes gegeben ist, d. h. $n - 0{,}05 \cdot n \leq x \leq n + 0{,}05 \cdot n$. Wenn der Begriff "etwa" in Kombination mit einem numerischen Wert n eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung angibt, ist der Wert n am stärksten bevorzugt, wenn nicht anders angegeben.

[0041] Wenn nicht anderes angegeben, hat ein unbestimmter Artikel "ein/eine" in Kombination mit einem Substantiv, der einen Gegenstand bezeichnet, beispielsweise "eine Mikrotiterplatte", "ein Protein", "ein Antikörper" selbstverständlich die Bedeutung "mindestens ein".

[0042] Der Begriff "Mikrotiterplatte" betrifft einen Kunststoffprobenhalter, der in der Biologie, Biochemie und Chemie weithin verwendet wird. Für Mikrotiterplatten wurde ein Standard durch die Gesellschaft für Biomolekulares Screening (SBS) im Jahre 1996 formalisiert. Eine Mikrotiterplatte hat gewöhnlich 96, 384 oder sogar 1536 Proben-Vertiefungen (die auch als Hohlräume bezeichnet werden), die in einer rechtwinkligen 2:3 Matrix angeordnet sind. Der Standard betrifft Vertiefungs-Abmessungen (beispielsweise Durchmesser, Abstand und Tiefe), sowie Platteneigenschaften (beispielsweise Abmessungen und Festigkeit). Ebenfalls sind im Stand der Technik Ständer mit Behältern bekannt, wie Röhrchen, die hinsichtlich der Basisoberfläche und dem Abstand der Röhrchen, die dem Abstand der Mikrotiterplatten-Hohlräume entsprechen, identische Abmessungen wie die Mikrotiterplatte aufweisen. Eine Reihe von Firmen haben automatische Handhabungs-Vorrichtungen ("Roboter") zur spezifischen Handhabung von SBS-Mikrotiterplatten sowie anderen Gegenständen entwickelt, deren Abmessungen mit dem SBS-Standard kompatibel ist. Dadurch wird die menschliche Arbeit, wie bei der Bearbeitung gefährlicher Materialien, entweder ersetzt oder vermehrt. Diese Roboter können Flüssigkeits-Handhabegeräte sein, die flüssige Proben von diesen Platten absaugen oder an diese abgeben, beispielsweise durch Mehrkanal-Pipettiervorrichtungen oder "Platten-Bewegungsvorrichtungen", die diese zwischen den Geräten transportieren. Gerätefirmen haben ebenfalls Plattenlesegeräte entwickelt. Plattenlesegeräte sind Laborgeräte, die zum Nachweis von biologischen, chemischen oder physikalischen Ereignissen in Proben ausgelegt sind, die in Mikrotiterplatten aufbewahrt sind.

[0043] Der Begriff "Aliquot" beschreibt eine Unterprobe, die hergeleitet wird von einem Divisor, der eine Probe oder allgemeiner ein größeres Ganzes in eine Anzahl von gleichen Teilen teilt; somit ist ein Aliquot eine Unterprobe oder ein repräsentativer Anteil der Probe, die aus einer solchen Unterteilung herrührt. Wenn nicht anders angegeben, sind die Aliquots der Proben, die aus einer Anordnung von Behältern oder von einer ersten Mikrotiterplatte zu einer zweiten Mikrotiterplatte überführt werden, selbstverständlich gleiche Mengen. Wenn beispielsweise Aliquots flüssiger Proben, die in den Vertiefungen einer ersten Mikrotiterplatte aufbewahrt werden, in die Vertiefungen einer zweiten Mikrotiterplatte durch Pipettieren überführt werden, überträgt jede einzelne Übertragung ein gleiches Volumen.

[0044] "PrP" bezeichnet das Prionprotein. Es kann in verschiedenen Formen existieren. Eine ist als PrPc bekannt und ist das normale Protein des Nicht-Krankheitstyps des Proteins, das man auf der Oberfläche bestimmter Zelltypen vorfindet. Eine ist als PrPsc bekannt, die man in den Gehirnen von Individuen vorfindet, die mit TSE infiziert sind. PrPsc ist ebenfalls als PrPres bekannt, was anzeigt, dass es mit Proteinasen schwer abzubauen ist. PrP(27–30) ist ein Fragment des Prionproteins, das proteolytisch durch Proteinase K abgebaut wird.

[0045] Der Begriff "Chaperon" betrifft ein Protein, das die korrekte Faltung der Proteine in vivo unterstützt; Chaperone bilden selbst keinen Teil der Strukturen, die sie beim Zusammenbau unterstützen.

[0046] Die Aminosäureidentifikation verwendet die Dreibuchstaben-Abkürzungen, sowie das Einbuchstaben-Alphabet von Aminosäuren, d. h. Asp D Asparaginsäuren, Ile I Isoleucin, Thr T Threonin, Leu L Leucin, Ser S Serin, Tyr Y Tyrosin, Glu E Glutaminsäure, Phe F Phenylalanin, Pro P Prolin, His H Histidin, Gly G Glycin, Lys K Lysin, Ala A Alanin, Arg R Arginin, Cys C Cystein, Trp W Tryptophan, Val V Valin, Gln Q Glutamin, Met M Methionin, Asn N Asparagin. Eine Aminosäure an einer bestimmte Position in einer Aminosäuresequenz wird durch ihre Dreibuchstaben-Abkürzung und eine Zahl angegeben. Bei der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR: 3 steht "Pro60" beispielsweise für den Prolinrest an der Aminosäureposition 60.

[0047] Der Begriff "optische Dichte" oder "OD" steht für die Fähigkeit eines Materials zur Lichtabsorption. Je dunkler das Material, desto höher die optische Dichte. Die optische Dichte wird gewöhnlich auf einer logarithmischen Skala von Einheiten der optischen Dichte (OD) ausgedrückt.

[0048] Das Design eines Hochdurchsatz-Nachweistests muss einfach und effektiv sein. In der Regel ist die Verringerung der Anzahl der Handarbeitsschritte in dem Arbeitsablauf des Tests vorteilhaft. Zu diesem Zweck erfordert ein Hochdurchsatz, dass jeder einzelne Schritt in dem Arbeitsablauf auf hochstandardisierte Weise erfolgt. Ein Pipettierschritt muss beispielsweise derart ausgelegt sein, dass die Übertragung einer abgemessenen Menge Flüssigkeit gewährleistet ist, die innerhalb von akzeptierten Fehlerrändern ist. Das Gleiche gilt für die Inkubationszeit, wenn das homogenisierte Probenmaterial mit Proteinase K behandelt wird. Auch werden mechanische Aktionen, wie das öffnen oder Schließen/Abdichten eines Gefäßes vorteilhaft so ausgelegt, dass nach dem Arbeitsschritt der Behälter entweder offen oder geschlossen ist, und dass keine unvollständigen oder Zwischenzustände (beispielsweise geschlossen aber nicht dicht, d. h. luft-/wasserdicht) möglich sind. Zu diesem Zweck versteht sich die Standardisierung eines Arbeitsschrittes in dem Arbeitsfluss als Verbesserung des Arbeitsschrittes, so dass man ein Ergebnis mit einem Fehlerbereich erhält, wodurch eine beliebiges

Ergebnis, das innerhalb der Fehlertoleranz liegt, immer noch alle nachfolgenden Arbeitsschritte unterstützt, vorausgesetzt, dass das Ergebnis jedes nachfolgenden Arbeitsschrittes innerhalb des entsprechenden Fehlerbereichs liegt.

[0049] Der Arbeitsablauf des erfindungsgemäßen Tests für den Nachweis der Prionen in Proben von Rinderhirnstamm umfasst (A) die Probenpräparation, (B) Probenbehandlung, (C) Probenanalyse, (D) Kontrollen und (E) Klassifizierung der Analyse-Ergebnisse als positiv oder negativ. Die Anzahl der Gewebeproben mit erwarteten negativen Testergebnissen ist höher als die Anzahl der Gewebeproben mit erwarteten positiven Testergebnissen.

(A) Probenherstellung

[0050] Die Erfinder haben einen Weg entwickelt, der die Verwendung von Behältern in Ständern in einem standardisierten Format ermöglicht, und zwar nicht nur für die Probenbehandlung und Analyse, sondern auch für die vorhergehenden Schritte der Probenherstellung. Erfindungsgemäß umfasst die Probenherstellung (A) die Schritte

(a) Bereitstellen in einem standardisierten Format, eines Ständers mit einem Satz einzeln beschrifteter Behälter, wobei der Behältersatz eine Untergruppe für Kontrollreaktionen (Kontrollbehälter), die wie in (D) vorgesehen verarbeitet werden sollen, und eine Untergruppe von Behältern für die Probenanalyse (Analysebehälter) umfasst,

(b) Bereitstellen in jedem Analysebehälter

(i) von 3 bis 6 kugelförmigen Perlen, wobei jede Perle zwischen 50 mg und 100 mg wiegt, und

(ii) einem Volumen an Homogenisierungspuffer, wobei der Homogenisierungspuffer ein proteolytisches Enzym enthält, das in Gegenwart eines chaotropen Mittels eine Proteolyse ausführen kann;

(d) Bereitstellen einer Gewebeprobe aus Gehirn, wobei die Gewebeprobe durch ein Etikett identifiziert wird, das einzigartige Informationen enthält, welche den Ursprung der Gewebeprobe definieren;

(e) Durchführen der Schritte

(i) Aufzeichnen des Etiketts der Gewebeprobe,

(ii) Überführen der Gewebeprobe in einen Analysebehälter,

(iii) Aufzeichnen des Etiketts des Analysebehälters,

(iv) Korrelieren der im Schritt (i) aufgezeichneten Informationen mit den im Schritt (iii) aufgezeichneten Informationen,

(v) Wiederholen der Schritte (i), (ii), (iii) und (iv), bis die gewünschte Menge an Analysebehältern in dem Ständer mit Probengewebe gefüllt ist;

(f) Durchführen der Schritte

(i) Verschließen der Behälter des Ständers mit Verschlussvorrichtungen, gefolgt von

(ii) Schütteln des Ständers mit den Behältern unter Verwendung einer Schüttelvorrichtung, wobei das Schütteln die Perlen vom Boden an die Oberseite jedes Analysebehälters bewegt, wodurch das Probengewebe darin homogenisiert wird, gefolgt von

(iii) Sedimentieren von Gewebetrümmern, vorzugsweise durch Zentrifugation, in den Analysebehältern, gefolgt von

(iv) Öffnen der Behälter und Absaugen eines Aliquots des Überstandes aus jedem Behälter.

[0051] Die Gewebeprobe wird vorzugsweise post mortem entnommen. Bevorzugte Proben sind Lymphknoten, Mandeln, und Gehirngewebe. Wird die Probe aus dem Lymphknoten oder dem Mandelgewebe entnommen, kann das Gewebe ebenfalls aus lebenden Individuen entnommen werden. Ein post mortem entnommenes Gehirngewebe ist am stärksten bevorzugt. Die Gewebeprobe hat ebenfalls vorzugsweise ein Gewicht zwischen 100 mg und 200 mg, stärker bevorzugt zwischen 125 und 175 mg. Noch stärker bevorzugt hat die Probe ein Gewicht von etwa 150 mg, am stärksten bevorzugt 150 mg ± 30 mg. Die Gewebeprobe wird aus dem Hirnstamm von Rind, Schaf, Elch oder Hirsch entnommen. Eine post mortem entnommene Humangewebeprobe ist auch bevorzugt. Am stärksten bevorzugt wird die Gewebeprobe aus Obexmaterial entnommen. Noch stärker bevorzugt wird das Probenmaterial aus dem Obex mittels Gewebeschneidevorrichtungen entnommen. Am stärksten bevorzugt ist die Verwendung einer Gewebeschneidevorrichtung zum Ausstanzen eines Gewebestücks einer definierten Masse. Die Gewebeprobe ist am stärksten bevorzugt eine autolysierte Hirngewebeprobe. Im letzteren Fall wird eine definierte Menge einer Probe, beispielsweise durch Pipettieren, entnommen.

[0052] Die Gewebeprobe wird dann in einen Probenbehälter überführt, der als "Behälter" bezeichnet wird. Der Behälter ist ein einzelnes Gefäß in einem Ständer mit standardisierten Abmessungen. Das standardisierte Format des Ständers ist vorzugsweise ein 8·12 Format, und der Ständer umfasst einen Satz von 96 Behältern. Eine Untergruppe von mindestens 16 Behältern pro Satz wird vorzugsweise für Kontrollreaktionen verwendet.

Somit werden von einem Satz von 96 Behältern mindestens 8 und bis zu 80 Behälter vorzugsweise als Analysebehälter verwendet.

[0053] Die Breite der Öffnung eines einzelnen Behälters ähnelt vorzugsweise der Breite der Öffnung einer einzelnen Vertiefung in einer Standard-Mikrotiterplatte mit 8·12 Format (das auch als "Format mit 96-Vertiefungen" bezeichnet wird). Der Begriff "ähnliche Breite" zeigt, dass sich die runde Öffnung eines einzelnen Behälters von der Breite der Öffnung einer einzelnen Vertiefung in einer Standard-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen um nicht mehr als 10% unterscheidet. Sämtliche Behälter in dem Ständer sind in Bezug auf die Form, Größe und das Volumen vorzugsweise identisch. Die Positionen der Behälter in dem Ständer sind die gleichen wie die Positionen der Vertiefungen in einer Standard-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen. Diese Anordnung ermöglicht vorteilhafterweise die Verwendung einer Mehrkanal-Pipettiervorrichtung für Standard-Format-Mikrotiterplatten bei der Überführung der Flüssigkeitsmengen in die Behälter.

[0054] Jeder Behälter hat vorzugsweise eine im Wesentlichen zylindrische Form, mit einer oben befindlichen runden Öffnung. Der Boden des Behälters kann ein flacher Boden oder vorzugsweise ein U-förmiger Boden sein. Der Behälter hat vorzugsweise ein Volumen zwischen 1 ml und 2 ml, stärker bevorzugt zwischen etwa 1,3 ml und etwa 1,6 ml, am stärksten bevorzugt etwa 1,4 ml. Noch stärker bevorzugt hat der Behälter einen Durchmesser von etwa 9 mm. Geeignete Behälter und Ständer zur Durchführung der Erfindung werden durch das Produkt mit dem Warenzeichen Traxis® Polypropylen-Ständer mit Deckel, gefüllt mit Traxis® 1,4 ml Polypropylen 2D codierten Röhrchen, bereitgestellt von Micronic BV (Lelystad, Die Niederlande), veranschaulicht, die von Integra Biosciences verteilt werde. Der Ständer mit den Behältern wird im 8·12 Format geliefert. Es sind aber auch andere Behälter und Ständer möglich.

[0055] Die Verwendung des 8·12 Formates für das gesamte Verfahren ist vorteilhaft gegenüber dem Stand der Technik. Insbesondere bei der Herstellung der Behälter zur Probenherstellung als Teile eines Hochdurchsatz-Prionentestkits macht die Verwendung des 8·12-Formates das Vorfällen der Behälter mit einem Homogenisierungspuffer unnötig, da dies effizienter mit Mehrkanalpipettierungsvorrichtungen, und sehr stark bevorzugt mit einem Pipettierroboter, erfolgen kann. Folglich müssen die Behälter nicht einzeln verschlossen werden, und kein Puffer kann aus falsch verschlossenen Behältern beim Transport oder bei der Lagerung entweichen. Zudem können die Inhaltsstoffe zur Herstellung des Homogenisierungspuffers als trockenes Material durch Wiederherstellen des Puffers bereitgestellt werden. Trockene Materialien ermöglichen eine längere Halbwertszeit eines Kits für Gewebe-Homogenisierung. Die Verteilung von wiederhergestelltem Homogenisierungspuffer kann effizient mittels Mehrkanalpipettiervorrichtungen, vorzugsweise automatisch, erfolgen.

[0056] Vor der Überführung des Probengewebes in einen Analysebehälter wird der Analysebehälter mit einer festgelegten Menge an kugelförmigen Perlen beladen. Es werden vorzugsweise 2 bis 6 Perlen, am stärksten bevorzugt 4 Perlen, in jeden Behälter geladen. Jede Perle wiegt vorzugsweise zwischen 50 und 100 mg. Stärker bevorzugt besteht die Perle aus einem Material oder einem Gemisch von Materialien mit einem spezifischen Gewicht von mindestens 5 g/cm^3 und bis zu 8 g/cm^3. Am stärksten bevorzugt ist das spezifische Gewicht etwa 6 g/cm^3. Bevorzugte Perlen werden durch einen niedrigen Abrieb durch Reibung während des Homogenisierungsverfahrens charakterisiert. Die Oberfläche der Perlen besteht vorzugsweise auch aus einem Material, das eine niedrige Bindungsaffinität gegenüber PrPsc hat. Stärker bevorzugt ist das Material kein Metall. Noch stärker bevorzugt besteht die Oberfläche der Perlen aus Zirkonoxid. Noch stärker bevorzugt bestehen die Perlen ganz aus Zirkonoxid. Zirkonoxid ist ein weißes kristallines Oxid; es ist im Stand der Technik von seiner Verwendung als Zellaufbruchvorrichtung bekannt. Die Perlen haben sehr stark bevorzugt ähnliche Größe. Bedeutenderweise kann die Größe der Perlen so ausgewählt werden, dass der Innendurchmesser des zylindrischen Behälters mindestens etwa 3 mm über dem Durchmesser einer beliebigen Perle ist. Am stärksten bevorzugt hat jede einzelne Perle vorzugsweise einen Durchmesser von etwa 3 mm ± 0,2 mm und ein Gewicht von etwa 80 mg, d. h. zwischen 75 und 85 mg. Beispielhafte Perlen zur Ausführung der Erfindung sind kommerziell erhältlich von Retsch GmbH & Co. KG (Haan, Deutschland), Artikel-Nr. 05.368.0090.

[0057] Die Perlen werden ebenfalls stark bevorzugt in den Behältern abgegeben, wobei eine Perlenabgabevorrichtung verwendet wird. Diese Geräte sind kommerziell erhältlich, beispielsweise von Qiagen GmbH, Deutschland (Katalog-Nummer 69973 oder 69975). Mit einem großen Vorteil werden die Ständer, die die mit Perlen beladenen Behälter fassen, vor der Durchführung der Probenherstellung durch Deckel verschlossen. Am stärksten bevorzugt verhindert ein Deckel beim Verschließen des Ständers, dass die Perlen aus den Behältern fallen, wenn der Behälter angestoßen wird. Dadurch können die Ständer mit den Behältern, die mit Perlen vorgeladen sind, vor dem Probenherstellungsverfahren bereitgestellt werden und aufbewahrt werden, wodurch die Handhabung der Ständer erleichtert wird.

[0058] Jeder Behälter hat ein einzigartiges Etikett, das die eindeutige Identifizierung des Behälters in einem einzelnen Ständer ermöglicht. Jeder Ständer trägt ein einzigartiges Etikett. Jeder Ständer trägt stärker bevorzugt ein einzigartiges Etikett, das die eindeutige Identifikation des Behälters in einer Anzahl von Ständern ermöglicht. Wird somit eine Gewebeprobe in einen Behälter überführt, wird die Gewebeprobe dem einzigartigen Etikett des Behälters zugeordnet, das weiterhin verfolgt werden kann. Diesbezüglich ist es sehr stark bevorzugt, dass das Etikett an jedem Behälter derart ausgelegt ist, dass es durch automatische Vorrichtungen abgelesen werden kann. Ein Beispiel dafür ist ein eindimensionaler oder zweidimensionaler Strichcode. Das Etikett befindet sich vorzugsweise auf dem Boden des Behälters. In der Praxis wird das Etikett, das vom Veterinärmediziner am Schlachthof ausgestellt wird, das das Tier identifiziert, aus dem die Gewebeprobe stammt, ausgelesen, und zwar vorzugsweise durch eine automatische Vorrichtung. Anschließend wird das Etikett des Behälters, in dem die Gewebeprobe aufbewahrt wird, ausgelesen. Die Informationen der beiden Etiketten wird als Datensätze in einer Datenbank gespeichert, und zwischen den beiden Datensätzen wird eine Verbindung herbeigeführt. Die Speicherung von Informationen, die Zuordnung einer Probe zu seinem Behälter und ihre weitere Aufspürung (Verfolgung) wird vorzugsweise durch einen Computer gesteuert. Der Computer stellt auch Speichervorrichtungen zum Aufspüren von Daten und Analyse-Software zum Analysieren von Aufspürungsdaten bereit.

[0059] Bevor die Gewebeproben in den Analysebehältern aufbewahrt werden, wird ein Messvolumen Homogenisierungspuffer in jeden Analyse-Behälter überführt. Vorzugsweise werden zwischen 500 µl und 1 ml Homogenisierungspuffer in jeden Behälter überführt. Stärker bevorzugt wird ein Homogenisierungspuffer von 900 µl bereitgestellt.

[0060] Gewöhnlich erfolgt die Pipettierung, wie die Überführung des Überführungspuffers, durch Pipettiervorrichtungen, und zwar entweder für manuellen oder automatischen Betrieb. Sehr stark bevorzugte Pipettiervorrichtungen sind eine Mehrkanal-Pipettier-Vorrichtung. Der Fachmann kennt mehrere solcher Mehrkanal-Vorrichtungen. Beispiele sind Pipetten mit 8 oder 12 Kanälen, die von Hand betrieben werden müssen. Die Mehrkanalpipette wird sehr stark bevorzugt durch eine automatische Vorrichtung betrieben, wie einen Pipettierroboter. Noch stärker bevorzugt wird die Mehrkanalpipette aus der Gruppe, bestehend aus einer Mehrkanalpipette mit 8 Kanälen, einer Mehrkanalpipette mit 12 Kanälen, einer Mehrkanalpipette mit 48 Kanälen und einer Mehrkanalpipette mit 96 Kanälen ausgewählt.

[0061] Der Homogenisierungspuffer ist vorzugsweise ein wässriger Puffer mit einem pH-Wert zwischen 7 und 8, umfassend ein Detergens, einen ungeladenen wasserlöslichen Zucker, ein Puffersalz, und ein Komplexierungsmittel, der zweiwertige Kationen komplexiert. Der Homogenisierungspuffer umfasst stärker bevorzugt Natriumlaurylsarkosin, Saccharose, HEPES und EDTA. Der Homogenisierungspuffer enthält vorzugsweise auch Proteinase K (beispielsweise rekombinant produzierte Proteinase K; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, beispielsweise Katalog-Nummer 3115852). Am stärksten bevorzugt enthält der Homogenisierungspuffer kein chaotropes Mittel, wie Harnstoff, Natriumiodid oder Guanidiniumsalz.

[0062] Da der Homogenisierungspuffer Proteinase K enthält, triggert der Beginn des Homogenisierungsverfahrens durch Schütteln später die proteolytische Spaltung, jedoch innerhalb der Grenzen, soweit PrPsc betroffen ist. Es wurde entdeckt, dass sich vor dem Beginn des Schütteins jegliche Spaltungsprozesse wenig auf das Ergebnis des Tests auswirken, sofern überhaupt.

[0063] Die Aktivität der Proteinase K bezüglich dieses Ziels wird durch Zugabe eines chaotropen Mittels in einem späteren Arbeitsschritt verstärkt. Das chaotrope Mittel multipliziert dann die Auswirkung der Proteinase K durch partielles Denaturieren von PrPsc, wohingegen die proteolytische Aktivität des Enzyms zum Großteil unbeeinflusst bleibt.

[0064] Nach Zugabe des Homogenisierungspuffer werden die Behälter in dem Ständer mit Verschlusskappen abgedichtet. Am stärksten bevorzugt ist die Verwendung von Verschlusskappen, die als Dichtungsmatte wie in WO 01/017682 bereitgestellt wird. Verschlusskappen für den Einmalgebrauch sind sehr stark bevorzugt. Sie bestehen auch sehr stark bevorzugt aus einem flexiblen Material. Die bevorzugte Dichtungsmatte ist im 8·12 Format und hält 96 Verschlusskappen. Die Positionen der Kappen werden zu den Positionen der Öffnungen in dem Ständer ausgerichtet. Die Matte wird derart auf den Ständer untergebracht, dass sich das untere Ende jeder Kappe über der Öffnung eines Behälters befindet. Die unteren Abschnitte der Verschlusskappen werden dann in die Öffnungen der Behälter durch Ausüben von Druck auf die Matte gepresst. Dies kann mit einer Walze erfolgen. Anschließend wird die Matte aus dem Ständer entfernt, wobei die Verschlusskappen in den Behältern verbleiben. Es wird vorzugsweise eine "Capcluster"-Matte zusammen mit einer "Capmat Sealer"-Vorrichtung verwendet, die von Micronic BV (Lelystad, Die Niederlande) bereitgestellt werden. Da sich das Ver-

schlussverfahren automatisieren lässt, ist der Verschluss der Behälter mit einer Automatik-Vorrichtung sehr stark bevorzugt.

[0065] Der Ständer mit den verschlossenen Behältern wird dann in die Halterung einer Schüttelvorrichtung untergebracht. Die Halterung ist vorzugsweise im Prinzip wie eine Schraubzwinge ausgelegt und hält den Ständer durch Pressen gegen den Boden des Ständers und der Verschlusskappen, die die Behälter verschließen.

[0066] Die Dichtigkeit des Verschlusses kann eingestellt werden, d. h. nötigenfalls verstärkt werden durch Steigern des Drucks der Halterung gegen die Verschlusskappen. Der Fachmann bestimmt die Dichtigkeit des Verschlusses, beispielsweise durch Füllen der Behälter zur Hälfte mit Wasser oder einer anderen Flüssigkeit, Verschließen und Abdichten der Behälter, Umdrehen der Ständerhalterung oder des Gehäuses, so dass die Flüssigphase in den Behältern die Verschlussdeckel vollständig bedeckt, so dass der Umgebungsluftdruck um ein bestimmtes Maß reduziert wird, und bestimmt wird, ob eine beliebige Flüssigkeitsphase aus den Behältern entweicht.

[0067] Der Ständer mit den verschlossenen Behältern wird mittels Schüttelvorrichtungen geschüttelt, d. h. mit einer Vorrichtung zur Ausübung einer Oszillationsbewegung. Die Schüttelvorrichtung ist vorzugsweise ein Schüttler. Eine sehr stark bevorzugte Schüttelvorrichtung ist der TissueLyzer Mixer Mill MM 300, der von Qiagen GmbH Hilden, Deutschland verkauft wird. Der Mixer Mill MM 300 stellt eine Ständerhalterung bereit, die Kontaktklauen zur Fixierung des Ständers und zugleich Ausübung von Druck auf die Verschlusskappen umfasst.

[0068] In jedem Behälter bewirkt das Schütteln, dass sich die Perlen vom Boden des Behälters nach oben bewegen, wodurch das Probengewebe homogenisiert wird. Das Gehäuse wird derart positioniert, dass die Behälter horizontal ausgerichtet werden, während sie geschüttelt werden. Die Behälter werden vorzugsweise mit einer Frequenz von mehr als 10 Hz und bis zu etwa 30 Hz geschüttelt. Sehr stark bevorzugt ist eine Frequenz von etwa 30 Hz. Die Frequenz von 30 Hz entspricht der Maximalgeschwindigkeit des Mischer Mills MM 300.

[0069] Zur Gewährleistung, dass die von der Schüttelvorrichtung ausgeübte Oszillationsbewegung auf alle Behälter ähnlich ausgeübt wird und von der Geometrie der Bewegung unabhängig ist, wird die Bewegung in zwei Durchgängen ausgeführt. Nach dem ersten Durchgang wird der Ständer mit den Behältern um 180° gedreht, und es erfolgt der zweite Durchgang. In jedem Durchgang wird die Probe mindestens 30 sec und nicht mehr als 15 min geschüttelt. In jedem Durchgang wird die Probe etwa 5 min geschüttelt.

[0070] Anschließend wird der Ständer mit den Behältern aus der Schüttelvorrichtung entfernt. Gewebetrümmer werden dann sedimentiert. Die Gewebetrümmer werden vorzugsweise durch Zentrifugieren des Ständers, stärker bevorzugt durch Zentrifugieren für 2 min bei 1000 × g, sedimentiert. Sämtliche Homogenisierungsschritte, einschließlich des Zentrifugationsschrittes werden vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 15°C und 30°C, am stärksten bevorzugt 22°C ± 5°C, durchgeführt.

[0071] Nach der Zentrifugation des Ständers werden die Verschlusskappen aus den Behältern mit einem Kappenentfernungswerkzeug ("Decapper", vertrieben von Micronics BV) entfernt; die Verschlusskappen werden verworfen. Die Entfernung der Verschlussvorrichtung lässt sich automatisieren, was sehr stark bevorzugt ist. Aus jedem Behälter wird ein Volumen von 150 µl Überstand (dies ist das Homogenat ohne größere Trümmerstücke) in die entsprechende Vertiefung der "Spaltungs/Entfaltungsplatte" pipettiert. Dieser Schritt kann automatisch erfolgen. Das Pipettieren erfolgt vorzugsweise mittels Mehrkanalpipettiervorrichtung. Danach werden die Behälter mit den Resthomogenaten wieder verschlossen, wobei Wegwerfverschlusskappen verwendet werden, wie oben beschrieben, und aufbewahrt. Die Behälter werden bis zu 8 Std. bei 5°C ± 3°C aufbewahrt. Die Behälter werden ebenfalls bevorzugt bis zu 1 Monat bei –20°C ± 5°C aufbewahrt.

[0072] Sehr stark bevorzugt wird eine automatische Probenaufspürung verwendet. In dem am stärksten bevorzugten Verfahren der Erfindung umfasst daher (A) zudem einen Computer, der mit Lesevorrichtungen, einer Datenbank, einer Software zur Steuerung der Datenbank, Probenaufspürungssoftware, und Datenausgabevorrichtungen ausgerüstet ist; und (A) Schritt (e) umfasst die Durchführung der Schritte von (i) Lesen des Etiketts der Gewebeprobe in den Computer und Speichern der Informationen des Etiketts in die Datenbank, (ii) Überführen der Gewebeprobe in einen Analysebehälter, (iii) Lesen des Etiketts des Analysebehälters in den Computer und Speichern der Informationen des Etiketts in die Datenbank, (iv) Korrelieren der gespeicherten Informationen von Schritt (i) mit den gespeicherten Informationen aus Schritt (iii), (v) Wiederholen der Schritte (i), (ii), (iii) und (iv), bis die gewünschte Menge der Analysebehälter in dem Ständer mit dem Probenbehälter

gefüllt ist.

(B) Probenbehandlung

[0073] Erfindungsgemäß wird (B) nach (A) durchgeführt und umfasst die Schritte

(a) Bereitstellen einer Mikrotiterplatte, wobei jede Vertiefung als Trockensubstanz eine festgelegte Menge eines chaotropen Mittels enthält (konditionierte Mikrotiterplatte), wobei das chaotrope Mittel an die Wand der Vertiefung gebunden ist, gefolgt von

(b) Überführen der Überstände von (A) Schritt (f) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, wobei das überführte Volumen derart gewählt wird, dass das Auflösen der Trockensubstanz in jeder Vertiefung zu einer Konzentration zwischen 300 mM und 2 M des chaotropen Mittels im Überstand führt, gefolgt von

(c) Inkubieren der Mikrotiterplatte, vorzugsweise unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur, wodurch das chaotrope Mittel gelöst wird; gefolgt von (d) Inkubieren der Mikrotiterplatte vorzugsweise unter stetigem Schütteln, bei einer Temperatur zwischen 15°C und 50°C, vorzugsweise zwischen 35°C und 45°C, am stärksten bevorzugt 42°C, wodurch die Proteolyse ermöglicht wird, gefolgt von

(e) Inhibieren der Aktivität des proteolytischen Enzyms, beispielsweise durch Zugeben einer wirksamen Menge Aprotease-Inhibitor zu dem Gemisch in jeder Vertiefung, gefolgt von

(f) Erhöhen der Konzentration des chaotropen Mittels in dem Gemisch in jeder Vertiefung auf einen Wert zwischen 3,5 M und 5 M, gefolgt von

(g) Inkubieren der Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur, wobei die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden, wodurch behandelte Proben bereitgestellt werden.

[0074] Die "Spaltungs/Entfaltungs"-Platte ist eine "konditionierte" Mikrotiterplatte. Während des Spaltungs/Entfaltungsschritts wird das Homogenat mit einem proteolytischen Enzym, vorzugsweise Proteinase K, in der Anwesenheit eines chaotropen Mittels behandelt. Unter den erfindungsgemäßen Bedingungen hydrolysiert das proteolytische Enzym PrPc. Ein Fragment von PrPsc widersteht jedoch der Protease und bleibt für den Nachweis verfügbar. Das proteaseresistente PrPsc-Fragment wird ebenfalls als "PrP (27–30)" bezeichnet. Sehr stark bevorzugt wird das Homogenat mit Proteinase K bei 2 µg/ml bis 2 mg/ml gespalten. Am stärksten bevorzugt ist eine Konzentration von ungefähr 100 µg/ml. Auch am stärksten bevorzugt wird das Homogenat in der Anwesenheit von etwa 1 M Guanidinhydrochlorid gespalten.

[0075] Das chaotrope Mittel wird auf der konditionierten Platte als Trockenmaterial bereitgestellt. Das Konditionierungsverfahren ist nachstehend beschrieben. Vorzugsweise wird eine absolute Menge zwischen 50 µM und 300 µM des trockenen chaotropen Mittels in jeder Vertiefung der konditionierten Mikrotiterplatte bereitgestellt. Stärker bevorzugt ist eine absolute Menge zwischen 100 µM und 200 µM des trockenen chaotropen Mittels. Am stärksten bevorzugt ist eine Menge von 150 µM des trockenen chaotropen Mittels.

[0076] Werden die Überstände überführt, werden die Koordinaten jeder Probe auf der 8·12 Spaltungs/Entfaltungsplatte vorzugsweise identisch gehalten wie in dem 8·12 Behälter-Ständer. Vertiefungen der Mikrotiterplatten, die Proben enthalten, welche zu den Analysebehältern zurückverfolgt werden können, werden als Analyse-Vertiefungen bezeichnet; entsprechend werden Vertiefungen, die zu den Kontrollbehältern zurückverfolgt werden können, auch als Kontrollvertiefungen bezeichnet. Die Spaltungs/Entfaltungsplatte ist vorzugsweise beschriftet. Es ist sehr stark bevorzugt, dass das Etikett der Platte aufgezeichnet wird und die aufgezeichneten Informationen des Plattenetiketts mit den aufgezeichneten Informationen des Ständers korreliert werden, der die Behälter fasst, aus denen der Überstand in die Vertiefungen der Platte überführt wird. Bei der Verwendung automatischer Probenverfolgung wird das Etikett der Platte stärker bevorzugt in den Computer gelesen und die Informationen des Etiketts werden in der Datenbank gespeichert. Die gespeicherte Information des Plattenetiketts wird mit der gespeicherten Information des Ständers korreliert, aus dem der Überstand in die Vertiefungen der Platte überführt wird.

[0077] Zur Bereitstellung der Maßnahmen für noch höheren Durchsatz von Proben und Kontrollen schlägt die Erfindung die Durchführung des Spaltungs/Entfaltungsschritts sowie der nachfolgenden Schritte in den Mikrotiterplatten in dem Format mit 384 Hohlräumen vor (das auch als "384-Format" bezeichnet wird). Abgesehen von Anpassungen, die in Bezug auf Volumina nötig sind, die in 384-Format-Mikrotiterplatten überführt werden sollen, kann das Mischen der Flüssigkeiten mittels Schütteln suboptimale Ergebnisse produzieren. In einem solchen Fall müssen alternative Mischeinrichtungen angewendet werden, wie das Einwirken von Ultraschall, temperaturinduzierte Konvektion oder Vibrationsnadeln. Alternativ können Keramikperlen, vorzugsweise Zirkonoxid-Perlen, in die Vertiefungen gegeben werden, so dass beim Schütteln die Mikrotiterplatte-Bewegung der Perlen das Mischen unterstützt. Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten im 384-Format wird die Probenverfolgung routinemäßig angepasst durch Zuordnen einer Probe, die zu Beginn in einem Behälter in einem

Ständer des 9·12-Formates homogenisiert wird, zu einer Vertiefung auf einer Koordinate einer Mikrotiterplatte im 384-Format. Für die Probe wird vorzugsweise die Koordinate auf der Spaltungs/Entfaltungs-Mikrotiterplatte in dem 384-Format während der nachfolgenden Schritte beibehalten, d. h. auf der Nachweis-Mikrotiterplatte im 384-Format. Im nachfolgenden Tests berücksichtigt die Beschreibung nur die Verwendung von 8 × 12 Mikrotiterplatten.

[0078] Bei der Zugabe der Überstände wird die Spaltungs/Entfaltungsplatte mit Verschlussfolie verschlossen und in einem laufenden Schüttler untergebracht. Die Platte wird vorzugsweise unter stetigem Schütteln bei 700 U/min ± 50 U/min. (Umdrehungen pro Minute) untergebracht. Eine erste Inkubation erfolgt für 14 min ± 2 min bei 22°C ± 5°C und konstanter Feuchtigkeit. Die Mikrotiterplatte wird dann auf einem laufenden Schüttler in einer Temperaturkammer bei 42°C ± 2°C untergebracht und unter stetigem Schütteln bei 700 U/min. ± 50 min (Umdrehungen pro Minute) für 30 min ± 2 min unter konstanter Feuchtigkeit inkubiert.

[0079] Die Erfindung umfasst zudem ein Verfahren zur Herstellung einer biologischen Probe, von der man annimmt, dass sie PrPsc enthält, so dass sie sich für einen spezifischen Nachweis von PrPsc eignet, wenn zugegen umfasst das Verfahren die Schritte:

(a) Homogenisieren der Probe; gefolgt von (b) proteolytischem Spalten der Probe durch Zugabe des Homogenats Proteinase K und Inkubieren der Probe; gefolgt von (c) Zugabe eines peptidischen Protease-Inhibitors zu dem inkubierten Gemisch von Schritt (b), wodurch eine behandelte biologische Probe erhalten wird, die sich für einen spezifischen Nachweis von PrPsc, sofern zugegen, eignet. Ein peptidischer Proteaseinhibitor ist beispielsweise ein Peptid, das einen Komplex oder ein Konjugat mit Proteinase K bilden kann, wodurch die proteolytische Aktivität der Proteinase K gehemmt wird. Ein bevorzugter peptidischer Proteinaseinhibitor für den erfindungsgemäßen Zweck ist ein Trypsininhibitor. Ein bevorzugter Trypsininhibitor ist ein Trypsininhibitor aus Sojabohne. Stärker bevorzugt ist ein Trypsininhibitor aus Eiweiß. Ein am stärksten bevorzugter Trypsininhibitor aus Eiweiß ist erhältlich von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland, Katalog-Nr. 0109878). Zur Gewährleistung einer effizienten Hemmung der Proteinase K ist die Konzentration des Trypsininhibitors 50- bis 150 mal, vorzugsweise 100 mal, so groß wie die molare Konzentration von Proteinase K in dem Gemisch aus Schritt (b). Somit umfasst die Erfindung auch eine Zusammensetzung, die Proteinase K und einen Trypsininhibitor enthält. Die Zusammensetzung umfasst vorzugsweise zudem ein chaotropes Mittel. Die Zusammensetzung umfasst stärker bevorzugt zudem ein Detergens. Noch stärker bevorzugt umfasst die Zusammensetzung zudem ein Material aus einer biologischen Probe, von der man annimmt, dass sie PrPsc enthält. Das Material der biologischen Probe wird am stärksten bevorzugt homogenisiert, lysiert oder wurde der Autolyse unterworfen.

[0080] Die Spaltung von (B) Schritt (d) wird durch Zugabe einer wirksamen Menge eines peptidischen Proteaseinhibitors und Erhöhen der Konzentration von Guanidinhydrochlorid, vorzugsweise auf eine Konzentration zwischen 3,5 M und 4 M (einschließlich 3,5 M und 4 M) beendet.

[0081] Ein am stärksten bevorzugter Proteaseinhibitor ist ein Trypsininhibitor aus Sojabohne. Ebenfalls bevorzugt ist die Zugabe eines Trypsininhibitors auf eine Endkonzentration zwischen 10 mg/ml und 20 mg/ml, noch stärker bevorzugt auf eine Endkonzentration zwischen 12 mg/ml und 15 mg/ml. Der Trypsininhibitor und das zusätzliche Guanidinhydrochlorid werden zusammen als konzentrierte Lösung hinzugefügt, die auch als "Entfaltungsreagens" bezeichnet wird. Die gesteigerte Konzentration des chaotropen Mittels bewirkt, dass sich das Proteinase-K-resistente PrP(27–30) entfaltet. Entfaltetes PrP(27–30) als Antigen ähnelt dem entsprechenden Teil von PrPc. Es können insbesondere bestimmte Antikörper verwendet werden, die für PrPc spezifisch sind, so dass entfaltetes PrP(27–30) erfasst wird.

[0082] Der Trypsininhibitor in dem Entfaltungsreagens wird zur Hemmung der proteolytischen Aktivität von Proteinase K während des aktuellen und der nachfolgenden Schritte benötigt. Nach der Zugabe des Entfaltungsreagens erfolgt eine Inkubation, vorzugsweise unter stetigem Schütteln bei 400 U/min ± 50 U/min; die Inkubationszeit nach der Zugabe des Entfaltungsreagens ist vorzugsweise zwischen 15 und 30 min, am stärksten bevorzugt 20 min ± 2 min. Die Inkubationszeit ist vorzugsweise 22°C ± 5°C.

[0083] Die Menge des chaotropen Salzes, das zu dem Homogenat bei Überführung zu der Spaltungs/Entfaltungsplatte zugegeben werden muss, kann im Prinzip durch Mischen einer konzentrierten Lösung mit dem Homogenat zugegeben werden, wodurch das Volumen der Probenlösung steigt. Da das Entfaltungsreagens als konzentrierte Lösung zugegeben werden muss, kommt es zu dem Problem, dass je höher das Volumen der Probenlösung ist, desto höher ist die benötigte Konzentration des Entfaltungsreagens: Das Volumen jeder Lösung sollte jedoch vorteilhafterweise so niedrig wie möglich sein, da die Spaltungs/Entfaltungsschritte in dem eingeschränkten Raum der Mikrotiterplatten-Vertiefung stattfinden muss. Die Viskosität der konzentrierten Lö-

sungen und der Probenlösung können ein Problem bereiten. Eine hochviskose konzentrierte Lösung kann das Verteilen der Lösung mittels Pipettiereinrichtungen erschweren und ungenau machen.

[0084] Dieses Problem wird zumindest partiell durch die Erfindung bewältigt, die eine "konditionierte" Spaltungs/Entfaltungsplatte bereitstellt. Somit wird erfindungsgemäß ein Verfahren für Konditionierungs-Vertiefungen einer Mikrotiterplatte geschaffen, umfassend die Schritte Abgeben einer Lösung von Guanidinhydrochlorid, gelöst in Wasser, in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, gefolgt von Verdampfen des Wassers. Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein bevorzugtes Verfahren zur Bereitstellung von trockenem Guanidinhydrochlorid in den Analyse-Vertiefungen. Erfindungsgemäß wird es bevorzugt, das Guanidinhydrochlorid an die Wände der Vertiefungen mit einer wasserlöslichen Helfersubstanz zu binden. Die Helfersubstanz wird durch ihre Fähigkeit zur Aufnahme von chaotropem Salz und zur vollständigen Anheftung an die Wand der Vertiefung ausgewählt, wenn das Lösungsmittel verdampft ist. Somit stellt die Erfindung eine konditionierte Mikroplatte bereit, die eine Anzahl von Vertiefungen umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass die Wände von einer oder mehreren Vertiefungen mit einem Gemisch aus einer wasserlöslichen Helfersubstanz und einem chaotropen Mittel beschichtet sind. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Konditionierung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zur Bindung der chaotropen Substanz an die Wände der Vertiefungen bereit, umfassend die Schritte: Lösen einer ersten Menge des chaotropen Mittels und einer zweiten Menge einer wasserlöslichen Helfersubstanz in Wasser; gefolgt von Überführen einer Menge der Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte; gefolgt von Verdampfen des Lösungsmittels, wodurch das Gemisch des chaotropen Mittels und der Helfersubstanz an der Wand des Hohlraums bindet. Die Erfindung stellt somit eine konditionierte Mikrotiterplatte bereit, erhältlich durch die Schritte: (i) Bereitstellen einer Mikrotiterplatte; (ii) Lösen einer ersten abgemessenen Menge des chaotropen Mittels und einer zweiten abgemessenen Menge eines wasserlöslichen Kohlenhydrats in Wasser, wodurch man eine Konditionierungslösung erhält; gefolgt von (iii) Verteilen eines abgemessenen Volumens der Konditionierungslösung in eine oder mehrere Vertiefungen der Mikrotiterplatte; gefolgt von (iv) Verdampfen des Lösungsmittels, wodurch das chaotrope Mittel und das Kohlenhydrat an die Wände der Vertiefungen gebunden werden, wodurch man eine konditionierte Mikrotiterplatte erhält.

[0085] Die chaotrope Substanz wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Harnstoff, Guanidiniumsalz, und Gemischen davon. Stärker bevorzugt ist die chaotrope Substanz ein Guanidiniumsalz. Noch stärker bevorzugt ist ein Guanidiniumsalz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, oder Gemischen davon. Guanidiniumhydrochlorid ist am stärksten bevorzugt. Eine bevorzugte Helfersubstanz ist ein Kohlenhydrat. Noch stärker bevorzugt ist, dass die Helfersubstanz ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Zuckermonomer, einem Zuckeroligomer, und einem Zuckerpolymer. Noch stärker bevorzugt ist das wasserlösliche Kohlenhydrat ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Monosaccharid, einem Disaccharid und einem Trisaccharid.

[0086] Die Helfersubstanz sollte den Nachweis des entfalteten PrP(27–30) in den nachfolgenden Schritten nicht stören. Somit muss der Fachmann bei der Auswahl der Helfersubstanz die Leistung des Tests mit und ohne die erwogene Helfersubstanz vergleichen. Eine am stärksten bevorzugte Helfersubstanz ist Saccharose. Die Konzentration der Helfersubstanz ist vorzugsweise zwischen 10 mM und 500 mM, stärker bevorzugt zwischen 50 mM und 100 mM. Am stärksten bevorzugt erfolgt die Konditionierung der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit einer wässrigen Lösung mit 3 M Guanidinhydrochlorid und 20 mg/ml Saccharose. Am stärksten bevorzugt wird ein Volumen von 50 µl der Lösung in jeden Analysevertiefung einer 8·12 Mikrotiterplatte überführt, und anschließend wird das Wasser aus der Mikrotiterplatte verdampft.

[0087] Beim Trocknen ist das verbleibende Wasser in dem Gemisch aus dem chaotropen Mittel und der Helfersubstanz vorzugsweise zwischen 0,5 und 5% (bezogen auf das Gewicht) des getrockneten Gemischs, vorzugsweise etwa 1%. Die Erfinder beachteten, dass die Helfersubstanz auch die Wirkung der hygroskopischen chaotropen Substanz reduziert, wobei Wasser aus der Feuchtigkeit in die umgebende Atmosphäre abgegeben wird. Trotzdem ist die Aufbewahrung einer konditionierten Mikrotiterplatte in einem luft- und wasserdichten Beutel, wie einem verschlossenen Kunststoffbeutel in der Anwesenheit von Trocknungsmaterial, wie Silicagel, bevorzugt.

[0088] Wie hier aufgeführt stellt die Erfindung auch die Verwendung einer konditionierten Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Durchführung eines Tests bereit. Der Test bestimmt die Anwesenheit oder Menge von PrPsc in einer biologischen Probe. Die Erfindung schlägt auch ein Teile-Kit vor, umfassend einen verschlossenen Beutel aus einem wasserdichten Material und mit einer Mikrotiterplatte gemäß der vorliegenden Erfindung. Das Kit umfasst zudem das Trocknungsmaterial, das in dem Beutel zugegen ist, der die konditionierte Mikrotiterplatte enthält.

(C) Probenanalyse

[0089] Die nachfolgenden Arbeitsschritte betreffen den Nachweis des Analyten, d. h. von entfaltetem PrP(27–30) in der behandelten Probenlösung. Erfindungsgemäß muss (C) nach (B) ausgeführt werden und es umfasst folgende Schritte

(a) Bereitstellen einer Mikrotiterplatte, die mit Streptavidin beschichtet ist (Nachweis-Mikrotiterplatte),

(b) Überführen eines Aliquots von jeder behandelten Probe von (B) Schritt (f) in eine Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, gefolgt von

(c) Zugeben eines drei- bis zehnfachen Volumens einer Nachweislösung zu dem Aliquot, die ein erstes und zweites Bindungsmittel enthält, das für zwei getrennte Epitope von entfaltetem PrP(27–30) spezifisch ist, wobei das erste spezifische Bindungsmittel biotinyliert ist und das zweite spezifische Bindungsmittel mit einem Reporterenzym konjugiert ist, gefolgt von

(d) Inkubieren der Nachweis-Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln, wodurch die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden und man Komplexe aus den spezifischen Bindungsmitteln und entfaltetem PrP(27–30) bilden lässt, gefolgt von

(e) Entfernen der Flüssigkeit aus den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer, gefolgt von

(f) Zugeben von Reporterenzym-Substratlösung zu den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Inkubieren der Platte, gefolgt von

(g) Durchführen der Schritte

(i) Messen des Umsatzes des Substrates in der Vertiefung als optische Dichte (CD), wodurch ein Messwert für die Vertiefung bereitgestellt wird, gefolgt von

(ii) Aufzeichnen des Messwertes, wobei eine Überablesung als CD = 4,0 aufgezeichnet wird,

(iii) Korrelieren des aufgezeichneten Messwertes von (ii) mit den Informationen, die für die entsprechende Gewebeprobe in (A) Schritt (e) Schritt (i) aufgezeichnet wurden,

(iv) Wiederholen der Schritte (i) bis (iii), bis die Messwerte im Hinblick auf alle Gewebeproben verarbeitet worden sind, wodurch Analysedaten in Bezug auf die Proben erhalten werden.

[0090] Zur Erleichterung der automatischen Probenverfolgung umfasst (C) Schritt (g) des Arbeitsablaufs vorzugsweise das Durchführen der Schritte

(i) Messen des Umsatzes des Substrates in einer Vertiefung als optische Dichte (CD), wodurch ein Messwert für die Vertiefung bereitgestellt wird, gefolgt von

(ii) Einlesen des Messwertes in den Computer, wobei eine Überablesung als CD = 4,0 eingestellt wird,

(iii) Speichern des Messwertes in der Datenbank,

(iv) Korrelieren des gespeicherten Messwertes von (ii) mit der Information, die für die entsprechende Gewebeprobe gespeichert wurde,

(v) Wiederholen der Schritte (i) bis (iv), bis die Messwerte im Hinblick auf alle Gewebeproben verarbeitet worden sind, wodurch Analysedaten in Bezug auf die Proben erhalten werden.

[0091] Eine bevorzugtes spezifisches Bindungsmittel ist beispielsweise ein Rezeptor für entfaltetes PrP(27–30), stärker bevorzugt ein Antikörper gegen entfaltetes PrP(27–30). Ein spezifisches Bindemittel hat mindestens eine Affinität von 10^7 l/mol für sein entsprechendes Zielmolekül. Das spezifische Bindungsmittel hat vorzugsweise eine Affinität von 10^8 l/mol oder noch stärker bevorzugt 10^9 l/mol für sein Zielmolekül. Wie der Fachmann weiß, wird der Begriff spezifisch verwendet, um anzuzeigen, dass andere Biomoleküle, die in der Probe vorhanden sind, nicht signifikant an das Bindemittel binden, das spezifisch für entfaltetes PrP(27–30) ist. Das Ausmaß der Bindung an ein anderes Biomolekül als das Zielmolekül führt vorzugsweise zu einer Bindungsaffinität von nur 10%, stärker bevorzugt nur 5% der Affinität des Zielmoleküls oder weniger. Ein am stärksten bevorzugtes spezifisches Bindungsmittel erfüllt sowohl die oben genannten Mindestkriterien für die Affinität, als auch für die Spezifität. Ein spezifisches Bindemittel ist vorzugsweise ein Antikörper, das mit entfaltetem PrP (27–30) reagiert. Der Begriff Antikörper betrifft einen polyklonalen Antikörper, einen monoklonalen Antikörper, Fragmente dieser Antikörper, sowie genetische Konstrukte, die die Bindungsdomäne eines Antikörpers umfassen.

[0092] Sehr stark bevorzugt werden monoklonale Antikörper für die Bindung des Analyten erhalten wie in WO 00/26238 beschrieben. Die monoklonalen Antikörper eines bevorzugten Antikörper-Paars, d. h. eines ersten (Fang-) und eines zweiten (Nachweis-) Antikörpers, erkennen spezifisch ein Prionprotein in seiner zellulären Form (PrPc). Sie erkennen stärker bevorzugt auch entfaltete linearisierte Formen von PrPc und PrPsc, einschließlich der mit Proteinase K verkürzten 27–30 kD-Form von PrPsc [d. h. PrP(27–30)]. Noch stärker bevorzugt reagieren die Antikörper des erfindungsgemäßen Tests unabhängig von der Glycosylierung von PrPc. Noch stärker bevorzugt sind die Antikörper spezifisch für die Beta-Form von PrP. Daher erfordert die Bindung

der Antikörper an PrPsc einen Entfaltungsschritt. Somit können die meisten bevorzugten Antikörper an PrP(27–30) unter Bedingungen binden, die das Vorhandensein von entfaltetem PrP(27–30) unterstützen. Das entfaltete PrP(27–30) wird vorzugsweise von einem ersten und einem zweiten spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden, wobei der erste Antikörper biotinyliert ist, und der zweite Antikörper mit einem Reporterenzym, wie alkalischer Phosphatase oder Peroxidase, konjugiert ist. Die Peroxidase (POD) ist am stärksten bevorzugt.

[0093] Nach dem Entfaltungsschritt wird ein Volumen von vorzugsweise 30 µl bis 50 µl, am stärksten bevorzugt 40 µl der Probenlösung aus jeder Vertiefung der Spaltungs/Entfaltungsplatte in die entsprechende Vertiefung einer Nachweisplatte überführt. D. h. die Koordinaten der Vertiefungen der Spaltungs/Entfaltungsplatte und der Nachweisplatte sind für eine gegebene Probenlösung identisch. Die Nachweisplatte ist mit Streptavidin beschichtet. Am stärksten bevorzugt wird die Nachweis-Mikrotiterplatte mit wärmebehandeltem Rinderserumalbumin beschichtet, das an Streptavidin gekoppelt ist, wie in EP 0 269 092 beschrieben. Die Erfinder beobachteten, dass die hohe Guanidin-Konzentration von etwa 4 M keine nachteilige Wirkung auf die Beschichtung der Nachweisplatte hat. Anschließend wird ein etwa fünffaches Volumen, am stärksten bevorzugt 200 µl einer Nachweislösung, die einen ersten biotin-konjugierten Fang-Antikörper und einen zweiten POD-konjugierten Nachweis-Antikörper enthält, zugegeben und gemischt. Das Volumen der Nachweislösung wird vorzugsweise so ausgewählt, dass sie die Guanidin-Konzentration effizient auf eine Konzentration im Bereich zwischen 0,1 M bis 1 M, vorzugsweise im Bereich zwischen 0,3 M bis 0,8 M, am stärksten bevorzugt im Bereich zwischen 0,5 bis 0,7 M, noch stärker bevorzugt auf eine Konzentration von etwa 0,65 M, reduziert. Die Platte wird mit Verschlussfolie verschlossen, und das Gemisch wird vorzugsweise auf einem Schüttler bei 400 U/min ± 50 U/min für 60 min ± 5 min bei 22°C ± 5°C inkubiert.

[0094] Bei der Entwicklung des Tests wurde gefunden, dass sich der Komplex aus entfaltetem PrP(27–30) und dem ersten und zweiten Antikörper in der Anwesenheit von Guanidiniumhydrochlorid bei einer Konzentration von etwa 0,65 M bildet. Gleichzeitig bindet unter diesen Bedingungen der Komplex an die Streptavidinbeschichteten Wände der Mikrotiterplatte. Das konjugierte Peroxidase-Enzym bleibt darüber hinaus aktiv. Somit wird der Nachweis von erfindungsgemäßem entfaltetem PrP(27–30) als Ein-Schritt-Verfahren ermöglicht.

[0095] Nach der Inkubation werden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte dreimal mit einer Waschlösung gewaschen. Danach werden die Vertiefungen mit einem Volumen, vorzugsweise 200 µl, TMB-Substrat-Lösung gefüllt. Die Platte wird vorzugsweise auf einem Schüttler bei 400 U/min ± 50 U/min für 10 min ± 2 min bei 22°C ± 5°C inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe eines Volumens TMB-Stopplösung, vorzugsweise 200 µl, beendet. Die Platte wird in einem Mikrotiterplatte-Plattenlesegerät untergebracht, vorzugsweise innerhalb von 10 min. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm wird gemessen und die Absorption bei 620 nm wird subtrahiert. Der resultierende Wert wird als Messwert für die optische Dichte (OD) aufgezeichnet. Gelegentlich kann ein "Überablesen" beobachtet werden. Ein Überablesen wird erhalten, wenn die optische Dichte der Lösung in einer Vertiefung die obere Nachweisgrenze des Mikrotiterplatte-Plattenlesegeräts überschreitet. In einem solchen Fall wird der OD-Wert willkürlich auf 4,0 eingestellt, damit sich Mittelwert, Ausschlusswert und Validitätsindex berechnen lassen [siehe unten, Teil (E)].

(D) Kontrollen

[0096] Erfindungsgemäß umfasst (D) die folgenden Schritte

(a) Bereitstellen eines Reagens, das ein rekombinant hergestelltes, lösliches Fusionsprotein enthält, das die Aminosäuresequenzen von (i) einem oder mehreren löslichen Trägerpolypeptiden, (ii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das erste spezifische Bindungsmittel abzielt, und (iii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das zweite spezifische Bindungsmittel abzielt, umfasst,

(b) vor der Durchführung der Schritte (A) Schritt (f) und des anschließenden Arbeitsablaufs Durchführen der folgenden Schritte

(i) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer ersten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von

(ii) Bereitstellen eines Aliquots des Homogenisierungspuffers von (A) Schritt (b) Schritt (i) in der ersten Menge an Kontrollbehältern, wodurch negative Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von

(iii) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (i) mit den negativen Kontrollen,

(iv) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer zweiten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von

(v) Bereitstellen, in der zweiten Menge an Kontrollbehältern, eines Aliquots einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Homogenisierungspuffer ohne das proteolytische Enzym und Homogenisierungspuffer, der zusätzlich eine wirksame Menge eines Proteaseinhibitors enthält, wodurch positive Kon-

trollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(vi) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (iv) mit den positiven Kontrollen, gefolgt von
(vii) Abgeben einer abgemessenen Menge an Kontrollreagens in jeden Kontrollbehälter,
(viii) Einschließen der positiven und negativen Kontrollen in (A) Schritt (f), (B) und (C) Schritte (a) bis (f),
(c) Durchführen der folgenden Schritte
(i) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine negative Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle negativen Kontrollen verarbeitet worden sind,
(ii) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (i) mit den für die negativen Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch negative Kontrolldaten erhalten werden,
(iii) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine positive Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle positiven Kontrollen verarbeitet worden sind,
(iv) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (iii) mit den für die positiven Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch positive Kontrolldaten erhalten werden.

[0097] Zur Erleichterung der automatischen Probenverfolgung umfasst (D) Schritt (b) des Arbeitsablaufs vor der Durchführung der Schritte (A) Schritt (f) und der folgenden Schritte vorzugsweise die Durchführung der folgenden Schritte
(i) Einlesen der Informationen auf den Etiketten einer ersten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a) in den Computer und Speichern der Informationen des jeweiligen Etiketts in der Datenbank, gefolgt von
(ii) Bereitstellen eines Aliquots an Homogenisierungspuffer in der ersten Menge an Kontrollbehältern, wodurch negative Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(iii) Korrelieren der gespeicherten Informationen von (i) mit den negativen Kontrollen,
(iv) Einlesen der Informationen der Etiketten einer zweiten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a) in den Computer und Speichern der Informationen des jeweiligen Etiketts in der Datenbank, gefolgt von
(v) Bereitstellen, in der zweiten Menge an Kontrollbehältern, eines Aliquots an Homogenisierungspuffer ohne das proteolytische Enzym, wodurch positive Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(vi) Korrelieren der gespeicherten Informationen von (iv) mit den positiven Kontrollen, gefolgt von
(vii) Abgeben einer abgemessenen Menge an Kontrollreagens in jeden Kontrollbehälter; und

[0098] (D) Schritt (c) umfasst die Durchführung folgender Schritte
(i) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine negative Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle negativen Kontrollen verarbeitet worden sind, gefolgt von
(ii) Korrelieren der gespeicherten Messwerte von (i) mit den für die negativen Kontrollen gespeicherten Informationen, wodurch negative Kontrolldaten bereitgestellt werden,
(iii) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine positive Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle positiven Kontrollen verarbeitet worden sind, gefolgt von
(iv) Korrelieren der gespeicherten Messwerte von (iii) mit den für die positiven Kontrollen gespeicherten Informationen, wodurch positive Kontrolldaten bereitgestellt werden.

[0099] Zur Bereitstellung einer Kontrollsubstanz zur Verifizierung der Fähigkeit des ersten und zweiten Bindungsmittels zur Bindung an PrP(27–30) kann das Prionprotein rekombinant in einem transformierten Organismus produziert werden. Die rekombinante Produktion der Kontrollsubstanz hat den Vorteil, dass das Produkt nicht infektiös ist. Gleichzeitig kann die Kontrollsubstanz so ausgelegt werden, dass sie durch proteolytische Enzyme spaltbar ist, wie Proteinase K.

[0100] Das rekombinant produzierte Prionprotein hat eine starke Tendenz zur Bildung unlöslicher Aggregate, insbesondere bei erhöhten Temperaturen. Aus diesem Grund stellt die Erfindung als Kontrollsubstanz ein rekombinant produziertes lösliches Fusionsprotein bereit, das die Aminosäuresequenzen von (i) einem oder mehreren löslichen Trägerpolypeptiden, (ii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das erste spezifische Bindungsmittel abzielt, und (iii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das zweite spezifische Bindungsmittel abzielt, umfasst. Die Erfinder haben entdeckt, dass ein Fusionsprotein, das ein oder mehrere Epitope von PrP(27–30) umfasst, in E. coli exprimiert, gereinigt und ohne ungewünschte Aggregatbildung aufbewahrt werden kann.

[0101] Erfindungsgemäß ist ein erstes bevorzugtes lösliches Träger-Polypeptid ein Chaperon. Sehr stark bevorzugt ist das slyD-Chaperon von E. coli oder ein Fragment davon. Das slyD-Genprodukt ist eine Pepti-

dyl-Prolyl-Cis-Trans-Isomerase (FKBP-Typ-Rotamase). Ein zweites bevorzugtes lösliches Träger-Polypeptid ist eine glycinreiche Aminosäuresequenz.

[0102] Als sehr stark bevorzugte Kontrollsubstanz stellt die Erfindung ein Protein der Formel S-L1-S-L2-hPrP-His-tag bereit, wobei S die E. coli SlyD-Chaperon-Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 1 oder ein Fragment davon ist, L1 und L2 eine erste und zweite glycinreiche Linker-Aminosäuresequenz sind, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein-Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR: 3 ist, und His-tag eine Histidin-Markierungssequenz ist. Histidin-tags befinden sich gemeinhin an entweder dem N- oder C-Terminus rekombinanter Proteine. Eine optimale Unterbringung der Markierung ist proteinspezifisch. Im Prinzip kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Histidin-tag die Proteinaktivität stören kann (Wu, J und Filutowicz, M., Acta Biochim. Pol. 46 (1999) 591–599), obgleich die relative kleine Größe und Ladung des Histidin-tags gewährleistet, dass die Proteinaktivität selten betroffen ist. Die Bewegung des Histidin-tags zum gegenüberliegenden Ende (Halliwell, C. M. et al., Anal. Biochem. 295 (2001) 257–261) oder das Durchführen der Reinigung unter denaturierenden bzw. renaturierenden Bedingungen löst oft dieses Problem.

[0103] Das Protein ist vorzugsweise ein Fusionsprotein. Das Beispiel 1 veranschaulicht, wie ein solches Fusionsprotein konstruiert werden kann. Folglich ist ein erfindungsgemäßes Protein sehr stark bevorzugt, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein die Formel S1-L-S2-L-M-hPrP-His-tag hat, wobei S1 ein Fragment der E. coli SlyD-Chaperon-Aminosäuresequenz von Position 1 bis Position 165 gemäß SEQ ID NR: 1 ist, wobei S2 ein Fragment der E. coli SlyD-Chaperon-Aminosäuresequenz von Position 1 bis Position 156 gemäß SEQ ID NR: 1 ist, L eine Linker-Sequenz gemäß SEQ ID NR: 2 ist, M ein Methionin ist, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein-Aminosäuresequenz von Position 23 bis Position 230 nach SEQ ID NR: 3 ist, und His-tag die Histidin-Markierungs-Sequenz nach SEQ ID NR: 4 ist.

[0104] Das Fusionsprotein ist ein wesentlicher Bestandteil des Kontrollreagens in dem erfindungsgemäßen Test. Ein bevorzugtes Verfahren zur Bereitstellung des Fusionsproteins umfasst die Schritte (a) Bereitstellen eines Vektor, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Fusionsprotein der Formel S-L1-S-L2-hPrP-His-tag codiert, wobei S die E. coli SlyD-Chaperon-Aminosäuresequenz SEQ ID NR: 1 oder ein Fragment davon ist, L1 und L2 eine erste und zweite glycinreiche Linker-Aminosäuresequenz sind, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein-Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR: 3 ist, und His-tag eine Histidin-Markierungssequenz ist; (b) Transformieren eines mikrobiellen Wirtsorganismus mit dem Vektor, gefolgt von (c) Züchten des transformierten mikrobiellen Wirtsorganismus in einem Wachstumsmedium, das Nährstoffe enthält, wobei der mikrobielle Wirtsstamm das Fusionsprotein exprimiert; gefolgt von (d) Reinigen des Fusionsproteins aus dem mikrobiellen Wirtsstamm und/oder Wachstumsmedium. Der Fachmann kennt eine große Zahl von Expressionssystemn, von denen viele kommerziell erhältlich sind. Gut entwickelte Expressionssysteme verwenden Bakterien oder Hefezellen als mikrobielle Wirtsorganismen. Somit ist der bevorzugte Wirtsorganismus ein Prokaryot oder Eukaryot. Bakterielle Expressionssysteme beruhen häufig auf E. coli, das ein am stärksten bevorzugter mikrobieller Wirtsorganismus ist. Ebenfalls am stärksten bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein die Formel S1-L-S2-L-M-hPrP-His-tag hat, wobei S1 ein Fragment der E. coli SlyD Chaperon-Aminosäuresequenz von Position 1 bis Position 165 gemäß SEQ ID NR: 1 ist, wobei S2 ein Fragment der E. coli SlyD-Chaperon-Aminosäuresequenz von Position 1 bis Position 165 nach SEQ ID NR: 1 ist, L eine Linker-Sequenz gemäß SEQ ID NR: 2 ist, M ein Methionin ist, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein-Aminosäuresequenz von Position 23 bis Position 230 nach SEQ ID NR: 3 ist, und His-Tag die Histidin-Markierungssequenz nach SEQ ID NR: 4 ist. Die codierende Sequenz umfasst vorzugsweise die Nukleotidsequenz von SEQ ID NR: 5.

[0105] Es wird weiter bevorzugt, dass das Fusionsprotein gereinigt wird, durch Durchführen der Schritte (i) Lysieren des mikrobiellen Wirtsorganismus, (ii) Zusammenbringen des Lysates von Schritt (i) mit einer teilchenförmigen Metallchelataffinitätsmatrix, die den Histidin-tag binden kann, wodurch das Fusionsprotein an der Matrix immobilisiert wird, gefolgt von (iii) Waschen der Matrix, wodurch das Fusionsprotein auf der Matrix immobilisiert wird, gefolgt von (iv) Eluieren des Fusionsproteins aus der Matrix, wodurch das Fusionsprotein gereinigt wird. Somit wird die Reinigung des Histidin-markierten Fusionsprotein durch immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie gereinigt. Dieses Verfahren ist ein weithin verwendetes Verfahren zur Reinigung rekombinanter Proteine, die einen kurzen Affinitäts-tag aufweisen, der aus Histidin-Resten besteht (Histidin-tag). Immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (beschrieben von Porath, J. et al., Nature 258 (1975) 598–599) beruht auf der Wechselwirkung zwischen einem Übergangsmetallion (Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}), die auf einer partikulären Metallchelatbildungsaffinitätsmatrix immobilisiert sind, und spezifischen Aminosäure-Seitenketten. Histidin ist die Aminosäure, die die stärkste Wechselwirkung mit immobilisierten Metallionenmatrizen aufweist, da Elektronendonatorgruppen am Histidin-Imidazolring, leicht Koordinationsbindungen mit dem immobilisierten Übergangsmetall eingehen. Proteine, die die Sequenzen der aufeinander folgenden Reste enthalten, wer-

den leicht auf der partikulären Metallchelatbildungsaffinität zurückgehalten. Nach dem Waschen des Matrixmaterials können die Histidinmarkierten Proteine leicht eluiert werden, indem entweder ein niedriger (saurer) pH-Wert des Säulenpuffers eingestellt wird oder durch Zugabe von freiem Imidazol.

[0106] Das NTA-Harz bildet ein vierzähniges Chelat und eignet sich besonders für Metallionen mit Koordinationszahlen von sechs, da zwei Wertigkeiten für die reversible Bindung der Biopolymere verbleiben. Ein weiteres Material, das zur Reinigung Histidinmarkierter Protein entwickelt wurde, ist TALON. Es besteht aus Co^{2+}, Carboxylmethylaspartat (Co^{2+}-CMA), das an ein festes Trägerharz gekoppelt ist. TALON weist Berichten zufolge weniger unspezifische Proteinbindung als das Ni^{2+}-NTA-Harz auf, was zu einer höheren Elutionsproduktreinheit führt (Chaga, G. et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 19–24; Chaga, G. et al., J. Chromatogr. A 864 (1999) 257–256).

[0107] His_6-markiertes Protein, wie das erfindungsgemäße Fusionsprotein, können beispielsweise an das Ni^{2+}-NTA in Niedrig- oder Hochsalzpuffern gebunden werden. In der vorliegenden Erfindung erfolgt der Immobilisierungsschritt vorzugsweise in der Anwesenheit von Imidazol. Unter diesen Bedingungen wird die unspezifische Bindung der anderen Histidin-haltigen Proteine reduziert. Nach der Bindung kann das Zielprotein eluiert werden, beispielsweise durch Auftragen einer Lösung mit einer hohen Konzentration von Imidazol oder Ausüben eines Imidazol-Gradienten. Das Waschen mit einer niedrigen Imidazol-Konzentration kann zur Reduktion einer unspezifischen Bindung der mikrobiellen Wirtsproteine mit Histidinen verwendet werden.

[0108] Das gereinigte Fusionsprotein wird als Trockensubstanz bereitgestellt, beispielsweise als Teil eines Teile-Kits. Zu diesem Zweck kann nach einer Änderung der Pufferbedingungen, beispielsweise durch Dialyse, ein Lyophilisat des Fusionsproteins hergestellt werden. Vor der Verwendung wird das Lyophilisat wieder in Puffer gelöst.

[0109] Der Fachmann schätzt, dass das erfindungsgemäße Fusionsprotein verwendet werden kann, um zu testen, ob ein Bindungsmittel einen Komplex mit einem Prionprotein (d. h. einem Prionprotein, das Epitope mit dem hPrP-Anteil des erfindungsgemäßen Proteins teilt) bilden kann. Ein solcher Test erfolgt als positive Kontrolle in dem erfindungsgemäßen Priontest. Die Erfindung stellt insbesondere ein Verfahren zur Bestimmung bereit, ob ein Bindungsmittel einen Komplex mit PrP(27–30) binden kann, umfassend die Schritte (a) Zusammenbringen eines Proteins nach einem der Ansprüche S1 bis S3 mit dem Bindungsmittel, (b) Bestimmen, ob sich ein Komplex aus Bindungsmittel und Protein gebildet hat, (c) Korrelieren des Ergebnisses mit der Fähigkeit des Bindungsmittels zur Bildung eines Komplexes mit PrP(27–30). Vor der Durchführung von Schritt (a) wird vorzugsweise PrP(27–30) durch die Wirkung der chaotropen Substanz entfaltet. In Bezug auf den Rezeptor oder das Bindungsmittel für PrP(27–30) wird das Bindungsmittel vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem polyklonalen Antikörper, einem monoklonalen Antikörper, Fragmenten dieser Antikörper, und genetischen Konstrukten, die die Bindungsdomäne eines Antikörpers umfassen.

[0110] Die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins (d. h. des Fusionsproteins) als Kontrollsubstanz in einem Test zur Bestimmung des Vorliegens von PrPc oder PrPsc in einer biologischen Probe ist ebenfalls Teil der Erfindung, entsprechend der Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins als Kontrollsubstanz in einem Tests zur Quantifizierung von PrPc oder PrPsc in einer biologischen Probe.

[0111] Wie die Daten aus Beispiel 3 nahe legen, hat das erfindungsgemäße Protein das Potential, dass es ein leistungsfähiges Immunogen ist, wodurch die Induktion hochspezifischer Antikörper gegen hPrP ermöglicht wird. Angesichts dieses Befundes ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Proteins zur Immunisierung eines Säugetiers Teil der Erfindung. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Proteins zur Produktion eines Antikörpers gegen ein Prionprotein ist ebenfalls Teil der Erfindung. Die Erfindung umfasst zudem eine injizierbare pharmazeutische Zusammensetzung zur Immunisierung eines Säugetiers, umfassend das erfindungsgemäße Protein und einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Die Erfindung umfasst zudem ein Konjugat zur Immunisierung eines Säugetiers, umfassend das erfindungsgemäße Protein und ein Protein, das in dem zu immunisierenden Säugetier immunogen ist.

[0112] Die Erfindung stellt zudem ein Teile-Kit bereit, umfassend das erfindungsgemäße Protein und ein Bindemittel, das spezifisch für ein Ziel ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus PrPc, PrPsc, PrP(27–30) und entfaltetem PrP(27–30). Sehr stark bevorzugt umfasst das Teile-Kit zudem ein weiteres Bindemittel, das spezifisch für ein Ziel ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus PrPc, TPrPsc, PrP(27–30) und entfaltetem PrP(27–30). Noch stärker bevorzugt umfasst ein Teile-Kit zudem Probenbehälter, ein proteolytisches Enzym, Puffer, eine chaotrope Substanz, eine Mikrotiterplatte, und ein chromogenes Substrat.

(E) Klassifizierung der Ergebnisse

[0113] Erfindungsgemäß muss (E) nach (A), (B), (C) und (D) durchgeführt werden und umfasst folgende Schritte

(a) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der positiven Kontrolldaten [M(p)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,

(b) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der negativen Kontrolldaten [M(n)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,

(c) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der Analysedaten [M(a)], die von (C) Schritt (d) geliefert werden,

(d) Berechnen eines Ausschlusswertes,

(e) Vergleichen des Messwertes einer Gewebeprobe, der von (C) Schritt (d) geliefert wird, mit dem Ausschlusswert von (d), gefolgt von

(f) Durchführen der Schritte

(i) Klassifizieren des Messwertes als positives Testergebnis, wenn der Messwert gleich oder größer als der Ausschlusswert ist, oder

(ii) Klassifizieren des Messwertes als negatives Testergebnis, wenn der Messwert kleiner als der Ausschlusswert ist, gefolgt von

(iii) Aufzeichnen des Testergebnisses und Korrelieren des Testergebnisses mit der Information, die für die entsprechende Gewebeprobe aufgezeichnet wurde, gefolgt von

(iv) Zuweisen des Testergebnisses zu der entsprechenden Gewebeprobe,

(g) Wiederholen der Schritte (e) und (f), bis die Messwerte aller Gewebeproben verarbeitet worden sind.

[0114] Zur Erleichterung der automatischen Probenverfolgung umfasst (E) Schritt (j) der Arbeitsablauf vorzugsweise die Durchführung der Schritte (i) Klassifizieren des Messwerts als positives Testergebnis, wenn der Messwert gleich oder größer als der Ausschlusswert ist, oder (ii) Klassifizieren des Messwerts als negatives Testergebnis, wenn der Messwert kleiner als der Ausschlusswert ist, gefolgt von (iii) Speichern des Testergebnisses in der Datenbank und Korrelieren des Testergebnisses mit der Information, die für die jeweilige Gewebeprobe gespeichert wird, gefolgt von (iv) Zuordnen des Testergebnisses zu der jeweiligen Gewebeprobe und Erzeugen eines Ausgangs, der das Testergebnis und die Informationen der Gewebeprobe umfasst.

[0115] Der Ausschlusswert ist in der Regel eine Maßnahme zur Unterscheidung der Messwerte negativer Proben von solchen der positiven Testproben. Ein Werkzeug zur Bestimmung der Eignung einer Formel zur Bestimmung eines Ausschlusswertes ist die Berechnung des Wertes "z" durch die Formel z = OD [Probe]/Ausschluss. Für jeden Messwert, der von einer Gewebeprobe hergeleitet ist, wird ein Wert z berechnet. Die Werte können zu Klassen gruppiert werden wie beispielhaft in **Fig. 12** und der dazu gehörigen Legende gezeigt ist. Die beiden gezeigten Verteilungen wurden gefunden, wenn der Ausschlusswert wie in Beispiel 8 beschrieben berechnet wurde. Die Verteilung, die sich aus den Werten für die negativen Proben ergibt, wird merklich von der Verteilung getrennt, die sich aus den Werten für die positiven Proben ergibt. Das Ziel Auffinden einer geeigneten Formel zur Bestimmung des Ausschlusswertes ist es im Wesentlichen zu verhindern, dass sich die beiden Verteilungen überlappen. Es wird jedoch stattdessen gewünscht, den Abstand der beiden Verteilungen zu steigern.

[0116] Es wird sehr stark bevorzugt, dass (E) zudem einen ersten Validitätstest nach Schritt (c) und vor Schritt (d) und Weitermachen bei Schritt (d) umfasst, unter der Voraussetzung, dass jeder der Punkte (i) bis (iv) wahr ist: (I) M(p) ist größer als 1,2, (ii) nicht mehr als 25% der Messwerte der positiven Kontrollen weichen von M(p) um mehr als 20% ab, (iii) M(n) ist kleiner als 0,2, (iv) nicht mehr als 25% der Messwerte der negativen Kontrollen weichen von M(n) um mehr als 20% ab. Es ist ebenfalls sehr stark bevorzugt, dass (E) Schritt (d) die Berechnung des Ausschlusswertes "c1" gemäß der Formel 1 umfasst.

$$c1 = a \times M(n) + b \qquad (I),$$

wobei "a" ein Wert zwischen 0,2 und 1, einschließlich 0,2 und 1, ist und "b" ein Wert zwischen 0,05 und 0,5 einschließlich 0,05 und 0,5, ist. Es ist zudem sehr stark bevorzugt, dass (E) Schritt (d) zusätzlich das Berechnen eines Validitätsindexes "v1" gemäß Formel II

$$v1 = c1 + M(a) \qquad (II)$$

und das Weitermachen mit den Schritten (e) bis (g) unter der Voraussetzung umfasst, dass der Wert von "v1" zwischen 1,5 und 7, einschließlich 1,5 und 7, ist.

[0117] Es ist ebenfalls sehr bevorzugt, dass (E) Schritt (d) das Berechnen des Ausschlusswertes "c2" gemäß Formel III umfasst

$$c2 = y \times M(n) + z \times M(p) \quad \text{(III)},$$

wobei "y" ein Wert zwischen 1 und 1,5, einschließlich 1 und 1,5, ist und "z" ein Wert zwischen 0,05 und 0,15, einschließlich 0,05 und 0,15, ist. Es ist zudem bevorzugt, dass (E) Schritt (d) zusätzlich das Berechnen eines Validitätsindexes "v2" gemäß Formel IV und eines Validitätsindexes "v3" gemäß Formel V

$$v2 = M(n)/M(p) \quad \text{(IV)}$$

$$v3 = M(a)/M(p) \quad \text{(V)}$$

und das Weitermachen mit den Schritten (e) bis (g) unter der Voraussetzung umfasst, dass der Wert von "v2" kleiner als 0,075 ist, wobei 0,075 nicht eingeschlossen ist, und der Wert von "v3" kleiner als 0,1 ist, wobei 0,1 nicht eingeschlossen ist.

[0118] Die folgenden Beispiele, Literaturstellen, Sequenzprotokolle und Figuren werden zur Unterstützung des Verständnisses der vorliegenden Erfindung bereitgestellt, deren wahrer Schutzbereich in den beigefügten Ansprüchen offenbart ist. Es versteht sich, dass die Modifikationen in den offenbarten Modifikationen vorgenommen werden können, ohne dass vom Geist der Erfindung abgewichen wird.

Beschreibung der Figuren.

[0119] Fig. 1 Schematische Zeichnung, das die Kassette gemäß Beispiel 1 und SEQ ID NR: 5 veranschaulicht. EcSlyD(1–165) zeigt eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR: 1 von Position 1 bis 165 codiert. EcSlyD(2–165) zeigt eine Nukleotidsequenz, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR: 1 von der Position 2 bis 165 codiert. L zeigt eine Nukleotidsequenz, die den Linker von SEQ ID NR: 2 codiert. hPrP(23–230) zeigt eine Nukleotidseqeunz, die ein Fragment des Humanprionproteins codiert, das von der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR: 3 von Position 23 bis 230 gegeben wird.

[0120] Fig. 2 Reinigungsprotokoll von SS-hPrP (23–230) wie dokumentiert durch SDS-PAGE. Das mit Coomassie gefärbte Gel zeigt (1) den Proteinstandard M12 (Novagen), (2) den E. coli-Rohextrakt, (3) den IMAC-Durchfluss, (4) das Imidazol-Eluat und (5) die SS-hPrP (23–230)-Dimer-Fraktion nach der Gelfiltration auf einer Superdex 200 Säule.

[0121] Fig. 3 UV-Spektrum des Fusionsproteins SS-hrPrP (23–230) nach der Matrix-unterstützten Rückfaltung und Imidazol-Schritt-Flution. Die Ordinate des Diagramms zeigt die Absorptionswerte, die Abszisse zeigt die Lichtwellenlänge in [nm]. Das Spektrum wurde auf einem Uvicon XS-Photometer mit einer Weglänge von 1 cm aufgezeichnet. Die Pufferbedingungen waren 50 mM Natriumphosphat pH-Wert 8,0, 100 mM Natriumchlorid und etwa 250 mM Imidazol.

[0122] Fig. 4 Die Form des Spektrums betont die bemerkenswerte Löslichkeit des chaperonisierten hPrP(23–230). Streulichteffekte, die Aggregations- oder Assoziations-Phänomene anzeigen, werden nicht beobachtet. Differentielle CD-Spektroskopie im nahen UV-Bereich. (A) Nahe UV-CD-Spektren wurden für das Trägermodul SS (Rhomben) und das Fusionsprotein SSPrp (Kreise) aufgezeichnet. Die Subtraktion des SS-Spektrums von dem SS-hPrP-Spektrum ergibt die durch Dreiecke angegebene Gerade, von der erwartet wird, dass sie die CD-Signal-Verteilung des Prionteils des Fusionsproteins darstellt. (B) Bei Umwandlung in mittlere Restgewichts-Elliptizität ergibt ein theoretisches hPrP (23–230)-Spektrum eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Diese Ergebnisse legen sehr stark nahe, dass sich SlyD(1–165) und Human-Prionprotein (23–230) als unabhängige Faltungsdomänen im Zusammenhang mit dem Fusionsprotein verhalten. Die Spektren wurden auf einem Jasco-720-Spektralpolarimeter aufgezeichnet. Die Pfadlänge betrug 0,5 cm, die Proteinkonzentration von SS und SS-hPrp (23–230) war jeweils 33 µM. Die Pufferbedingungen waren 50 mM NaP pH-Wert 7,8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, die Reaktion war 2 s. Die Spektren wurden akkumuliert (9x), damit das Signal-Rauschen-Verhältnis verbessert wurde.

[0123] Fig. 5 Unterschiedliche Restlöslichkeit von S-hPrP und SS-hPrP nach einer Langzeitinkubation bei erhöhten Temperaturen. Die beiden Fusionsproteine wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (von oben nach unten: 8°C, 35°C, 45°C, 50°C und 55°C) unter identischen Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen. Danach wurden sie auf Aggregatbildung mittels FPLC-Analyse auf einer Superdex 200 Größenaus-

schlusssäule untersucht. Die Fig. 5A zeigt eine betonte Aggregationstendenz von S-hPrP bei Temperaturen über 45°C. Die resultierenden Aggregatteilchen eluieren nicht aus der Säule, aber Wechselwirken offensichtlich mit der Superdex-Matrix. Die Ausbeute von SS-hPrP ist sehr hoch (Fig. 5B). Darüber hinaus wird die Aggregationstendenz in dem Zwillings-Trägerfusionskonstrukt SS-hPrP signifikant reduziert.

[0124] Fig. 6 Das Chaperon-Trägermodul SS steigert signifikant die Thermotoleranz von Human-Prionprotein. SS-hPrP und S-hPrP wurden einer thermischen Entfaltung unterworfen (max. bei einer Temp. von 80°C) und auf ihre Löslichkeit nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur untersucht. S-hPrP eluiert zwar hauptsächlich als hochmolekulares Aggregat (mit Dreiecken markierte Gerade), SS-hPrP eluiert jedoch in der Regel als lösliches Dimer (mit Kreisen markierte Gerade). Das Ergebnis zeigt an, dass das SS-Trägermodul die Umkehrbarkeit der thermisch induzierten Entfaltung steigert.

[0125] Fig. 7 Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wie in Beispiel 7 beschrieben; I: Messwerte, erhalten für die positiven Kontrollen. Jede Messung ist durch ein Dreieck veranschaulicht. Die x-Achse des Diagramms zeigt die Plattennummer, die y-Achse zeigt die OD-Werte.

[0126] Fig. 8 Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wie in Beispiel 7 beschrieben; II: Messwerte erhalten für die negativen Kontrollen. Jede Messung ist durch ein Dreieck veranschaulicht. Die x-Achse des Diagramms zeigt die Plattennummer, die y-Achse zeigt die OD-Werte.

[0127] Fig. 9 Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wie in Beispiel 7 und Beispiel 8 beschrieben; III: Ausschlusswerte, berechnet nach Beispiel 8. Jede Messung ist veranschaulicht durch ein Dreieck. Die x-Achse des Diagrams zeigt die Plattennummer, auf einer logarithmischen Skala zeigt die y-Achse die Ausschlusswerte.

[0128] Fig. 10 Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wie in Beispiel 7 und Beispiel 8 beschrieben; VI: Das Diagram zeigt die Messwerte, die mit Gewebeproben aus Rind erhalten wurde, das mit einem Referenztestsystem mit einem negativen Ergebnis untersucht wurde. Das Referenztestsystem ist von der Europäischen Union offiziell genehmigt. Jeder Messwert wird durch ein Dreieck veranschaulicht. Die x-Achse des Diagrams zeigt die Probennummer, die y-Achse zeigt die OD-Werte. Die durchgezogene Linie zeigt den Ausschlusswert an.

[0129] Fig. 11 Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus dem Gehirn entnommen wurde, wie in Beispiel 7 und Beispiel 8 beschrieben; V: Das Diagram zeigt die Messwerte, die mit Gewebeproben aus Rind erhalten wurden, das mit einer Referenztestsystem mit positivem Ergebnis untersucht wurde. Das Referenztestsystem ist von der Europdischen Union offiziell genehmigt. Jeder Messwert wird durch ein Dreieck veranschaulicht. Die x-Achse des Diagramms zeigt die Probennummer, die y-Achse zeigt die OD-Werte. Überablesungen sind als OD 4,0 wie in Beispiel 8 beschrieben angegeben.

[0130] Fig. 12 Diagramm, das die Ergebnisse einer Feldstudie zeigt. Der Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Anwesenheit von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde, wurde in verschiedenen Laboratorien durchgeführt, wie in den Beispielen 7 und 8 beschrieben. Für jeden Messwert, der von einer Gewebeprobe hergeleitet wurde, wurde ein Wert z = OD {Probe]/Ausschlusswert bestimmt. Die x-Achse veranschaulicht Werte für "z". Die x-Achse zeigt diskrete Intervalle. Berechnete Werte für "z", die in ein Intervall fallen, sind als Klasse gruppiert, für die die Mitgliedsgröße auf der y-Achse angezeigt ist. Feste Balken veranschaulichen die Klassen, die mit positiv getesteten Proben erhalten wurden, offene Balken veranschaulichen die Klassen, die mit negativ untersuchten Proben erhalten wurden.

Beispiel 1

Konstruktion eines Expressionsplasmids, das Tandem E. coli SlyD und hPrP(23–230) enthält

[0131] Auf der Basis des pET24a-Expressionsplasmids von Novagen (Madison, WI, USA) wurden die folgenden Klonierungsschritte durchgeführt. Der Vektor wurde mit NdeI und XhoI gespalten und eine halbsynthetische Kassette nach Fig. 1 mit der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR: 5, umfassend tandem-E. coli SlyD (auch als EcSlyD bezeichnet) und hPrP(23–230), wurde eingebracht. Demnach codierte der rekombinante Expressionsvektor ein Fusionsprotein der Formel S-L-S-L-M-hPrP-His-Tag, wobei S ein Fragment der E. coli

SlyD Chaperon-Aminosäuresequenz von Position 1 bis Position 165 nach SEQ ID NR: 1 ist, L eine Linkersequenz nach SEQ ID NR: 2 ist, M ein Methionin ist, hPrP ein Fragment der Human-Prion-Präprotein-Aminosäuresequenz von Position 23 bis Position 230 nach SEQ ID NR: 3 ist, H eine Histidin-tag (His-tag)-Sequenz nach SEQ ID NR: 4 ist. Das codierte Fusionsprotein wird weiterhin auch als SS-hPrP (23–230) bezeichnet.

Beispiel 2

Reinigung des SS-hPrP(23–30)-Fusionsproteins

[0132] E. coli BL21 (DE3) Zellen, die das Expressionsplasmid von Beispiel 1 enthalten, wurden in LB-Medium mit Kanamycin auf eine OD600 von 1 gezüchtet, und eine cytosolische Überexpression wurde durch Zugabe von Isopropyl–beta-D-thiogalactosid (IPTG) auf eine Endkonzentration von 1 mM bei einer Wachstumstemperatur von 37°C induziert. 4 Std. nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 5000 × g) geerntet, gefroren und bei –20°C aufbewahrt. Für die Zelllyse wurde das gefrorene Pellet in 100 mM Natriumphosphat pH-Wert 8,0, 7,0 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl), 10 mM Imidazol bei Raumtemperatur resuspendiert, und die resultierende Suspension wurde gerührt, so dass die Zelllyse für 2 Std. beendet wurde. Nach der Zentrifugation und Filtration wurde das Lysat auf eine Ni-NTA (Nickelnitrilotriacetat)-Säule aufgetragen, die in dem oben genannten Lysepuffer vorinkubiert wurde. Der in diesem Schritt erhaltene Durchfluss wird als "IMAC"-Durchfluss bezeichnet. Nach einem ausgiebigen Waschschritt (> 20 Säulenvolumina Lysepuffer) wurde der chaotrope Lysepuffer durch 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert 7,8, 100 mM Natriumchlorid ersetzt, so dass sich matrixgebundenes Protein zurückfalten konnte (mindestens 10 Säulenvolumina Rückfaltungspuffer wurde aufgebracht, damit restliches GuHCl in chaotropen Konzentrationen entfernt wurde). Das native Fusionsprotein wurde eluiert durch Auftragen eines Elutionspuffers, der 500 mM Imidazol in 50 mM Natriumphosphat pH-Wert 7,8, 100 mM Natriumchlorid ("Imidazol-Eluat") enthielt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf Reinheit (SDS-PAGE, ebenfalls siehe **Fig. 2**) untersucht und vereinigt. Schließlich wurde das Protein einer Größenausschlusschromatographie unterworfen und die Dimerfraktion wurde vereinigt, eingeengt und auf seine spektroskopischen Eigenschaften untersucht.

Beispiel 3

UV-spektroskopische Charakterisierung des SS-hPrP (23–230)-Fusionsproteinss

[0133] Man beachte, dass SS-hPrP(23–230) als lösliches Protein eluiert. Der hPrP-Anteil scheint wie das native Protein gefaltet zu sein. Die UV-Spektren des rekombinant produzierten und matrix-rückgefalteten Fusionsproteins (siehe Beispiel 2) zeigen keine Aggregationstendenz. Wie in der **Fig. 3** gezeigt, ist die Grundlinie des UV-Absorptionsspektrums von SS-hPrP(23–230) in physiologischen Pufferbedingungen nahezu gleich der Abszisse (über 310 nm), was anzeigt, dass keine lichtstreuenden Partikel vorhanden sind, die von Selbstassoziations- oder Aggregationsphänomenen herrühren. hPrP(23–230) allein zeigt dagegen eine beträchtliche Aggregationstendenz, wenn es auf die in Beispiel 2 beschriebenen Weise zurückgefaltet wird (Spektren nicht gezeigt). Es wurde beobachtet, dass hPrP(23–230) allein sichtbare Aggregate innerhalb von Stunden bildet, wenn es in phosphatgepufferter Salzlösung bei Raumtemperatur inkubiert wird.

[0134] Die Form des in **Fig. 3** gezeigten Spektrums weist auf eine lösliche leicht handhabbare Polypeptid-Variante von hPrP (23–30), das sich als diagnostisches Werkzeug (beispielsweise als Protein-Standard) als geeignet erweisen sollte. Es könnte sich auch als leistungsfähiges Immunogen herausstellen, das die Induktion hochspezifischer Antikörper gegen hPrP ermöglicht. Zusammengefasst erleichtert das hier beschriebene Verfahren die geeignete rekombinante Produktion einer löslichen Variante des Human-Prionproteins in hohen Mengen (Ausbeute > 10 mg Fusionsprotein/g Feuchtgewicht). Die Reinheit des Fusions-Polypeptids übersteigt 90% nach einem einfachen oben beschriebenen Zweischritt-Chromatographie-Protokoll. Man beachte, dass vergleichbare Ergebnisse für S-hPrP(23–230), d. h. einem Fusionsprotein der Formel S-L-hPrP-H, gefunden wurden. Somit verleihen das Zwillings-Chaperon-Träger-SS sowie das Einzel-Träger-S dem Human-Prionprotein (23–230) Löslichkeit.

Beispiel 4

CD-spektroskopische Charakterisierung des SS-hPrP (23–230)-Fusionsprotein

[0135] Zur Beantwortung der Frage, ob der hPrP(23–230)-Anteil als Teil des Fusionsproteins eine Faltung ähnlich wie das native Protein annimmt, wurden CD-Spektren im nahen UV-Bereich aufgenommen. Da CD (Cirkulardichroismus)-Signale im nahen UV-Bereich (260–320 nm) eine geordnete Molekülumgebung der aro-

matischen Reste widerspiegeln, sind CD-Spektren im nahen UV-Bereich eine geeignete Sonde zur Charakterisierung globulär gefalteter Proteine. Sowohl das Träger-Modul-SS [d. h. SlyD(1–165)-((GGGS)$_5$GGG)-SlyD(2–165)] als auch das vollständige Fusionsprotein SS-hPrP(23–230) zeigen charakteristische CD-Signale im nahen UV-Bereich (Fig. 4). Wenn das SS-Trägersignal von dem SS-hPrP(23–230)-Signal subtrahiert wird, ähnelt das resultierende Spektrum stark den typischen Prion-CD-Spektren, die in der Literatur beschrieben sind (Hornemann et al., FEBS Lett. 413 (1997), 277–281). Somit stellt das Ergebnis dieses differentiellen Spektroskopie-Experimentes einen bestechenden Beweis bereit, dass hPrP(23–230) im Fusions-Zusammenhang gefaltet und nativartig ist, und zwar trotz der Anwesenheit von zwei kovalent gebundenenen SlyD-Trägereinheiten. Dies legt stark nahe, dass das Trägermodul die strukturelle Integrität des Human-Prionproteins nicht beeinträchtigt.

Beispiel 5

Thermotoleranz des SS-hPrP(23–230)-Fusionsproteins

[0136] Zur Beantwortung der Frage, ob ein zusätzliches Trägermodul die Thermotoleranz (und somit die Lebensdauer steigern) von hPrP(23–230) steigern kann, wurden sowohl SS-PrP [d. h. SlyD(1–165)-((GGGS)$_5$GGG)-SlyD(2–165)-((GGGS)$_5$GGG)-hPrP(23–230)-His-Tag] als auch S-PrP [d. h. SlyD(1–165)-((GGGS)$_5$GGG)-hPrP(23–230)-His-Tag] thermischem Stress unter identischen Bedingungen unterworfen. Danach wurden beide Fusionsproteine auf ihre Restlöslichkeit mittels FPLC-Analyse untersucht. Ausgeprägte Unterschiede wurden zwischen SS-hPrP und S-hPrP nach einer Langzeitinkubation bei erhöhten Temperaturen unterworfen. Bei Inkubation über Nacht bei Temperaturen über 50°C fällt S-hPrP fast quantitativ aus, und es gibt fast kein Protein mehr, das bei einem Gelfiltrationslauf auf einer Superdex 200 Säule (Fig. 5A) nachweisbar ist. Wenn jedoch SS-hPrP auf die gleiche Weise vorbehandelt wird, ist die Proteinausbeute nach der Gelfiltration fast quantitativ (Fig. 5B). Diese Befunde legen stark nahe, dass das zusätzliche Chaperon-Trägermodul SlyD signifikant die Löslichkeit des Zielmoleküls hPrP (23–230) steigert, und zwar mutmaßlich durch Unterstützung der Umkehrbarkeit der thermisch induzierten Entfaltung. Sie weisen auch auf den Schluss, dass die beiden Trägereinheiten in dem Fusionskonstrukt SS-hPrP kooperativ arbeiten.

[0137] Die Löslichkeitswirkung des Chaperon-Trägers wird ebenfalls nach einer kurzen Inkubation bei erhöhter Temperatur hervorgehoben: Sowohl SS-hPrP als auch S-PrP wurden einer thermischen Entfaltung bei identischen Proteinkonzentrationen (24 µM jeweils) und Pufferbedingungen unterworfen. Zu diesem Zweck wurde ein 1 cm Küvette in der thermostabilen Halterung untergebracht, und die Temperatur wurde von 20°C auf 80°C innerhalb eines 1 Std. Laufs (1°C/min) erhöht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben einer FPLC-Analyse wie beschrieben unterworfen und auf Löslichkeit untersucht. Es stellte sich heraus, dass der Hauptteil von S-hPrP als hochmolekulares Aggregat eluiert, wohingegen SS-hPrP hauptsächlich als lösliches Dimer eluiert. (Fig. 6).

[0138] Dies schafft einen erheblichen Vorteil von S-hPrP und SS-hPrP gegenüber dem "unchaperonisierten" Prionprotein. Zusammengefasst sind die Chaperon-Fusionskonstrukte von hPrP(23–230) in Bezug auf die Thermotoleranz und die Löslichkeit besser als das unchaperonisierte Protein.

Beispiel 7

Prion-Test

Liste der Kit-Bestandteile

[0139]

Tabelle 1

Fläschchen Nr./Deckel	Etikett	(a) Inhalt/(b) Funktion
1 farblos	Homogenisierungs-Puffer	(a) 100 ml, 3x konzentriert, klare Lösung, schäumt möglicherweise (b) Homogenisierungspuffer
2a blau	Kontrollreagens	(a) Etwa 500 ng/ml Kontrollsubstanz (rekombinant produziertes Fusionsprotein) in stabilisatorhaltigem Puffer, (b) Ausschluss-Kontrolle
2b blau	Kontrollpuffer	(a) 8 ml Puffer mit Konservierungsmitteln, klare Lösung (b) löst das Kontrollreagens
2c blau	Kontrolllösung	(a) 25 ml, enthält Stabilisatoren und Konservierungsmittel, schäumt möglicherweise (b) Ausschlusskontrolle
3 violett	Spaltungsreagens	(a) rekombinant produzierte Proteinase K in Puffer mit Konservierungsmitteln, rotes Lyophilisat (b) Spaltung von PrP
4a grün	Stopppuffer	(a) 40 ml, Puffer mit PrP-freisetzenden Verbindungen und Konservierungsmitteln (Präzipitate möglich) (b) löst Stoppreagens
4b grün	Stoppreagens	(a) 3 Fläschchen mit Proteinase K-Inhibitor, weißes Lyophilisat (b) Beenden der Proteinase K-Spaltung und Freisetzen von PrP
5 rot	Anti-PrP-Biotin	(a) monoklonaler Antikörper aus Maus, weißes Lyophilisat (b) Fang-Antikörper
6 rot	Anti-PrPPeroxidase (HRP)	(a) monoklonaler Antikörper aus Maus, Fab-Fragment konjugiert mit Peroxidase, weißes Lyophilisat (b) Nachweis-Antikörper
7 rot	Inkubationspuffer	(a) 80 ml, enthält Detergens und Konservierungsmittel, klare Lösung, schäumt möglicherweise (b) Antikörper-Inkubationspuffer.
8 weiß	Waschpuffer	(a) 100 ml, 5x konzentriert, enthält Detergens und Konservierungsmittel, klare Lösung, schäumt möglicherweise (b) Waschen der Nachweisplatte
9 schwarz	TMB Substratlösung	(a) 80 ml, klare Lösung (b) Nachweis
10 schwarz	TMB Stopplösung	(a) 20 ml, 0,94 N Schwefelsäure, klare Lösung (b) Nachweis
11	Spaltungsplatte	(a) 3 Mikrotiterplatten, Rundboden, weißes Pellet (b) Durchführen der Spaltungs- und Freisetzungsschritte
12	Nachweisplatte	(a) 3 Mikrotiterplatten, Module mit 8 Vertiefungen in einem Rahmen; mit Streptavidin vorbeschichtet; (b) Nachweisplatte
13	Verschlussfolie	(a) 15 Folien (b) Verschließen der Spaltungs- und Nachweisplatten
14	Etiketten für die Arbeitslösungen	(a) 3 Etiketten für jede Lösung (b) Beschriftung der Homogenisierungs-Arbeitslösung (1x) und Waschpuffer (1x)
BSE: = Spongiforme Encephalopathie beim Rind; Fab: = Fragment-Antikörper-Bindung HRP: = Meerrettichperoxidase aus Pferd PrP: = Prionprotein		

B Liste der Einweggegenstände

(a) Gewebeschneider

(b) Homogenisierungskit, mit Ständern, gefüllt mit 96 einzelnen codierten (alphanumerisch oder 2D-Strichcode) Röhrchen (Behältern), wobei jedes Röhrchen mit 4 Homogenisierungsperlen gefüllt ist; ebenfalls bereitgestellt werden Verschlussdeckel (Capcluster) zum Verschließen während der Homogenisierung der Proben, Zusätzliche Capcluster werden zum Verschließen der Behälter bereitgestellt, wenn die Proben aufbewahrt werden sollen.
(c) Konditionierte Mikrotiterplatte zur Spaltung/Entfaltung

C Bevorzugte weitere Ausrüstung

(a) Ultrareines Wasser, mindestens äquivalent zu Wasser Grad 3 wie durch ISO3696: 1987 (E) definiert.
(b) Pipettiereinrichtungen; kalibrierte Pipetten, Volumina 10 µl–200 µl (CV < 3%), variable Volumenpipettiereinrichtung mit Pipettierspitzen, die sich für 0,1 ml und 0,9 ml (Genauigkeit: < 0,5%) eignen.
(c) Ausrüstung zur Probenregistrierung und Probenverfolgung
(d) Mikrotiterplattenhomogenisator mit Hochgeschwindigkeitsfrequenz von mindestens 30 Hz oder 1800 Oszillationen pro Minute
(e) Mikrotiterplatten-Zentrifuge, die mindestens 1000 × g liefern kann und einen Swinging-Gucket-Rotor für 2 Platten mit tiefen Vertiefungen hat.
(f) Mikrotiterplatten-Inkubator (einschließlich Schüttelfunktion): Temperaturgesteuert, Schüttlergenauigkeit < 1,0, Temperaturbereich 40°C–50°C, Schüttelbereich: mindestens 700 U/min, Schüttel-Kreis: mindestens 1,5 mm.
(g) Mikrotiterplatten-Schüttler: Kreisförmige Oszillierung, Schüttelkreis: 3 mm, kann eine kontrollierte Frequenz von 100–1000 U/min liefern.
(h) Mikrotiterplatten-Wäscher mit mindestens 2 Ventilen, Abgabegenauigkeit: ≤ 4% (300 µl), Abgabevolumen mindestens 300 µl, kreuzweises Absaugen: < 2 µl/Vertiefung, einstellbare Einstellungen des Verteilers.
(i) Mikrotiterplatten-Lesegerät, photometrisch; Standard-Filter (450 nm und 620 nm) oder kontinuierlicher Filter (400 nm–700 nm), Messbereich: 0–4000 Abs, Auflösung: 0,001 Abs, Standard-Schnittstelle zum Computer.
(k) Roller, 30–50 U/min.
(l) Rechnersoftware empfohlen
(m) Automatisches System

D Herstellung der Arbeitslösungen

[0140] Es darf nur ultrareines Wasser bei 22°C (Raumtemperatur: RT) für die Verdünnungen verwendet werden. Für die Wiederherstellung der Lyophilisate muss ein Roller verwendet werden.

Tabelle 2

Arbeitslösung	Wiederherstellung/Herstellung der Arbeitslösung
Homogenisierungspuffer Lösung 1	Inhalt von Flasche 1 mit 200 ml ultrareinem Wasser bei 22°C ± 5°C verdünnen und sorgfältig bis zur Homogenität mischen.
Kontrollreagens Lösung 2a	Wiederherstellen des Lyophilisates in 6 ml Kontrollpuffer (Flasche 2b) bei 22°C ± 5°C und bis zum Erhalt einer klaren Lösung sorgfältig mischen (mindestens 15 min).
Kontrollpuffer Lösung 2b	Gebrauchsfertige Lösung, Temperatur vor Gebrauch auf 22°C ± 5°C erhöhen.
Kontrolllösung Lösung 2c	Gebrauchsfertige Lösung, Temperatur vor Gebrauch auf 22°C ± 5°C erhöhen.
Spaltungsreagens Lösung 3	Wiederherstellen des Lyophilisates in 10 ml ultrareinem Wasser bei 22°C ± 5°C und sorgfältig mindestens 5 min bis zum Erhalt einer klaren roten Lösung mischen.
Stopppuffer Lösung 4a	Temperatur auf 22°C ± 5°C erhöhen, Präzipitate für mindestens 30 min bis zum Erhalt einer klaren farblosen Lösung mischen
Stoppreagens Lösung 4b	Wiederherstellen des Lyophilisates in 12 ml Stopppuffer (Lösung 4a) bei 22°C ± 5°C und sorgfältig bis zum Erhalt einer klaren farblosen Lösung mischen.
Anti-PrP-Biotin Lösung 5	Wiederherstellen des Lyophilisates in 1 ml ultrareinem Wasser bei 22°C ± 5°C und sorgfältig bis zum Erhalt einer klaren farblosen Lösung mischen.
Anti-PrP-Peroxidase- Lösung 6	Wiederherstellen des Lyophilisates in 1 ml ultrareinem Wasser bei 22°C ± 5°C und sorgfältig bis zum Erhalt einer klaren farblosen Lösung mischen.
Inkubationspuffer Lösung 7	Gebrauchsfertige Lösung, vor Gebrauch Erhöhen der Temperatur auf 22°C ± 5°C; leicht opaleszent, farblose Lösung.
Waschpuffer Lösung 8	Verdünnen des Inhalts von Flasche 8 mit 400 ml ultrareinem Wasser bei 22°C ± 5°C und sorgfältig mischen.
TMB Substrat-Lösung Lösung 9	Gebrauchsfertige Lösung, vor dem Gebrauch Erhöhen der Temperatur auf 22°C ± 5°C.
TMB-Stopp-Lösung Lösung 10	Gebrauchsfertige Lösung, vor dem Gebrauch Erhöhen der Temperatur auf 22°C ± 5°C.
Homogenisierungslösung Lösung 11	Für 96 Vertiefungen: Zugeben von 3 ml wiederhergestelltem Spaltungsreagens (Lösung 3) zu 97 ml Homogenisierungspuffer (Lösung 1) und Mischen bis zur Homogenität bei 22°C ± 5°C, was eine klare rosa Lösung ergibt.
Nachweislösung Lösung 12	Für 96 Vertiefungen: Zugeben von 0,3 ml wiederhergestelltem anti-PrP-HRP (Lösung 6) und 0,3 ml anti-PrP-Biotin (Lösung 5) zu 25 ml Inkubationspuffer (Lösung 7) und vorsichtig mischen für mindestens 15 min, was eine leicht opaleszente Lösung ergibt.

[0141] Der Test ist zur Verwendung von frischem gefrorenem und autolysiertem Probenmaterial ausgelegt.

[0142] Die Proben dürfen kein geronnenes Blut enthalten. Die Kontrollen werden zeitgleich mit jeder Mikroplatte durchgeführt. Sämtliche Proben werden in einer einzelnen Analyse untersucht. Zur Untersuchung der Proben wird vorzugsweise eine Rechensoftware verwendet.

E. Pipettierschema für die Mikrotiterplatte

[0143] Das bevorzugte Pipettierschema für eine 8·12 Mikrotiterplatte ist in der Tabelle 3 angegeben, welche eine Darstellung des Layouts der Vertiefungen einer 8·12 Mikrotiterplatte ist, oder ein Ständer mit Behältern im 8·12 Format.

Tabelle 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C–	S1									
B	C+	C–	S2									
C	C+	C–	S3									
D	C+	C–										
E	C+	C–										
F	C+	C–										S78
G	C+	C–										S79
K	C+	C–										S80
Schlüssel: C+ = Kontrolle positiv; C– = Kontrole negativ; S1-S80 = Proben 1-80le												

F Probenmaterial

[0144] Im Schlachthof wurde die Probe von Hirnstamm (Medulla oblongata) durch das Foramen magnum (Schädelöffnung zum Rückenmark) mit einem speziell entwickelten Löffel entnommen. Die Probe wird in einem Transportbehälter aufbewahrt, fest verschlossen und geeignet beschriftet, damit man sie absolut eindeutig identifizieren kann, und dann in das Labor überführt.

[0145] Im Labor wird jede Probe in einer Datenbank registriert und beschriftet.

G. Homogenisierung

[0146] Die Homogenisierungsschritte werden gemäß dem in Tabelle 3 durchgeführten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 4

Schritt	Vorgang	Menge/Vertief.	Zeit/Temp.
1	Pipettieren der Homogenisierungslösung 1x (Lösung 11) in alle Röhrchen (Spalte 2–12) der Homogenisierungsplatte (siehe Pipettierschema).	0,9 ml	RT
2	Pipettieren der Kontrolllösung (Lösung 2c) in alle Röhrchen (Spalte 1) der Homogenisierungsplatte (siehe Tabelle 3)	0,9 ml	RT
3	Öffnen des Behälters in einer Sicherheitswerkbank und Überführen der Medulla oblongata auf ein Kissen. Einmal ein definiertes Stück des Opex schneiden und Überführen in ein Röhrchen der Homogenisierungsplatte von Spalte 3–12 (nach Tabelle 3)	150 ± 30 mg	RT
4	Pipettieren von Kontrollreagens (Lösung 2a) in alle Röhrchen der Spalte 1–2 (siehe Tabelle 3).	100 µl	RT
5	Alle Röhrchen der Platte fest mit dem Capcluster verschließen und in geeigneter Position auf einem Homogenisationsgerät festklammern. Die Probe ist bei RT für bis zu 60 min stabil.		RT
6	Homogenisieren bei Maximalgeschwindigkeit (30 Hz)		5 min RT
7	Abnehmen der Platte, um 180° drehen und erneut gegen die Probenplatte klammern		
8	Homogenisieren bei Maximalgeschwindigkeit (30 Hz)		5 min RT
9	Abnehmen der Platte aus dem Homogenisator und Überführen in eine Mikroplattenzentrifuge. Zentrifugieren bei 1000 × g.		2 min RT
RT = Raumtemperatur, 22°C ± 5°C			

H Spaltung

[0147]

Schritt	Vorgang	Menge/Vertief.	Zeit/Temp.
10	Entfernen der Deckel und Überführen der Kontrollen und Homogenste in die Spaltungsplatte. Homogenisierungsplattenröhrchen mit Capcluster fest verschließen und aufbewahren.	150 µl	RT
11	Verschließen der Spaltungsplatte mit einer Verschlussfolie und Unterbringen auf einem laufenden Schüttler (600 U/min ± 50 U/min) unter konstanter Feuchtigkeit.		RT 14 ± 2 min
12	Überführen der Spaltungsplatte auf einem laufenden Schüttelinkubator (700 U/min ± 50 U/min) unter konstanter Feuchtigkeit.		42 ± 2°C 30 ± 2 min
13	Zugeben von Stoppreagens (Lösung 4b) in jede Vertiefung, 3x durch Auf- und Abpipettieren mischen und Verschließen der Platte mit einer Verschlussfolie. Inkubieren auf einem Schüttler (400 ± 50 U/min) unter konstanter Feuchtigkeit.	100 µl	RT 20 ± 2 min

J Nachweis

[0148] Die Nachweisschritte werden wie in der Tabelle 4 angegeben, durchgeführt.

Schritt	Vorgang	Menge/Vertief.	Zeit/Temp.
14	Pipettieren von Aliquots aus jeder Vertiefung der Spaltungsplatte in die entsprechenden Vertiefungen der Nachweisplatte gemäß dem Pipettierschema.	40 µl	RT
15	Pipettieren der Nachweislösung (Lösung 12) in jede Vertiefung der Nachweisplatte, mindestens einmal mischen und verschließen der Platte mit einer Verschlussfolie, Inkubieren auf einem Schüttler (400 ± 50 U/min) unter konstanter Feuchtigkeit	200 µl	RT 60 ± 5 min
16	Entfernen der Lösung aus jeder Vertiefung durch Absaugen oder Ausklopfen. 3x Waschen mit Waschpufferlösung (Lösung 8).	3 × 300 µl	RT
17	Zugeben von TMB-Substratlösung (Lösung 9) und Verschließen der Platte mit Verschlussfolie, Inkubieren auf einem Schüttler (400 ± 50 U/min) unter konstanter Feuchtigkeit	200 µl	RT 10 ± 2 min
18	Zugeben von TMB-Stoppllösung (Lösung 10)	50 µl	RT
19	Unterbringen der Nachweisplatte in das Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 min und mischen für 10 s. Messen der Absorption bei 450 nm (Subtrahieren der Absorption bei 620 nm)		RT 10 s
20	Sichern der Primärdaten unmodifizierbar auf einem Computer		

Beispiel 8

Ausschlussberechnung und Interpretation der gemessenen Daten

Eine Dateneinstellung

[0149] Die Absorptionswerte der negativen Kontrolle wurden zur Berechnung der Mittelwerte verwendet, die zum Einstellen des Ausschlusswertes verwendet werden.

[0150] Der Mittelwert für die Proben und die positive Kontrolle wird zur Verfifikation der Testfunktion verwendet.

Schritt	Vorgang
Berechnung der Mittelwerte	
1	Berechnung des Mittelwertes für die 8 positiven Kontrollen (Spalten A–H)
2	Berechnung des Mittelwertes für die 8 negativen Kontrollen (Spalte 2, Reihe A–H).
3	Berechnung des Mittelwertes für alle Proben (n ≥ 8) Spalten 3-12, Reihe A–H).
Überprüfen der Mittelwerte auf Validität	
4	a) Der Mittelwert der positiven Kontrollen muss über CD 1,2 sein. b) Nur zwei Werte von 8 positiven Kontrollen werden mit einer Abweichung vom Mittelwert von mehr als 20% akzeptiert. c) Der Mittelwert für die negativen Kontrollen muss unter CD 0,2 sein. d) Nur zwei der Werte von 8 negativen Kontrollen werden mit einer Abweichung vom Mittelwert von mehr als 20% akzeptiert.
5	Werden die Validitätsanforderungen nicht erfüllt, muss der Test wiederholt werden.

[0151] Für die Dateninterpretation werden mindestens 8 Proben auf einer Mikrotiterplatte analysiert. Für Bewertungszwecke ist es notwendig, dass die Anzahl der erwarteten negativen Proben höher als die erwartete Anzahl der positiven Proben ist. ÜBER-Ablesungen werden als OD 4,0 interpretiert.

B Berechnung des Ausschlusswertes

[0152] Der Mittelwert der negativen Kontrolle wird zur Berechnung des Ausschlusswertes verwendet.

Schritt	Vorgang
6	Berechnen des Ausschlusswertes "c" durch die Formel: c = 0,5 × Mittelwert der negativen Kontrolle + OD 0,25
7	Dieser Ausschlusswert muss durch Anwenden des folgenden Verfahrens verifiziert werden.
Überprüfen der Glaubwürdigkeit des Ausschlusses durch Verwendung des Mittelwertes der Proben und des Ausschlusswerts	
8	Dividieren des Ausschlusswertes durch den Mittelwert für alle Proben.
9	Der Ausschluss wird verifiziert und die Testleistung ist akzeptabel, wenn der in Schritt 8 erhaltene Quotient zwischen 1,5 und 7 ist.
10	Wenn nur eines der vorstehend genannten Kriterien nicht erfüllt wird, ist die Platte ungültig und der Test muss wiederholt werden

C Bestimmung der reaktiven Proben

[0153] Jede Probe, von der sich herausstellt, dass sie oberhalb des Ausschlusses ist, wird als anfangs reaktiv eingestuft, d. h. sie hat ein positives Testergebnis.

Schritt	Vorgang
11	Vergleichen der Werte der Proben mit dem Ausschluss.
12	Auswählen von denjenigen, die gleich oder größer als der Ausschluss sind.
13	Beschriften dieser Proben als reaktiv (positives Testergebnis).

[0154] Anfangs reaktive Proben werden vorzugsweise im Doppelansatz erneut getestet. Für das erneute Testen und die Dateninterpretation werden mindestens 8 Proben auf einer Neutestplatte analysiert. Für die Ausschlussberechnung muss die Anzahl der erwarteten negativen Proben höher sein als die erwartete Anzahl positiver Proben. Die Homogenate in den relevanten Probenbehältern werden vorsichtig gemischt und bei 1000 × g für 2 min zentrifugiert. Die Spaltungsschritte gemäß Beispiel 7 H und die Nachweisschritte nach Beispiel 7 J werden mit dem Homogenat und frisch präparierten Kontrollen durchgeführt. Das ganze Verfahren wird im Doppelansatz durchgeführt. Wenn zwei von drei Tests für eine anfangs reaktive Probe als reaktiv neu getestet wird, wird die Probe als wiederholt reaktiv beschriftet.

[0155] D Dokumentation der Daten Der Test erfolgt vorzugsweise unter kontrollierten Bedingungen und alle Daten, die während der Testdurchführung produziert werden, werden dokumentiert, d. h. aufgezeichnet. Insbesondere die Nachvollziehbarkeit von der Probennahme bis zum Ergebnis wird ohne jegliche Abweichung dokumentiert. Die Rohdaten werden derart gespeichert, dass jede Dokumentenänderung offen liegt. Zur Gewährleistung der Einhaltung dieser Anforderungen ist sehr stark ein geeignetes Qualitätsmanagementsystem bevorzugt, beispielsweise gemäß EN ISO/IEC 17025: 2000.

Beispiel 9

Reaktivität der positiven und negativen Kontrollen, Bestimmung des Ausschlusswerts

[0156] Der Test wie er in Beispiel 7 und in Beispiel 8 beschrieben wurden, wurde in drei professionellen Laboratorien durchgeführt. Positive und negative Kontrollen wurden durchgeführt und die Messwerte wurden aufgezeichnet. Die **Fig. 7** und **Fig. 8** sind graphische Darstellungen der Messwerte für die Kontrollen. Die **Fig. 9** ist eine graphische Darstellung der erhaltenen Ausschlusswerte.

Liste der Literaturangaben

Chaga, G. et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 19–24
Chaga, G. et al., J. Chromatogr. A 864 (1999) 257–256
Halliwell, C. M. et al., Anal Biochem. 295 (2001) 257–261
Hornemann et al., FEBS Lett. 413 (1997), 277–281 Porath, J. et al., Nature 258 (1975) 598–599

SEQUEN2PROTOKOLL

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Hochdurchsatz-Priontests

<130> 22787

<150> EP 04027088.6
<151> 2004-11-15

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 196
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(196)
<223> Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase des FKBP-Typs (Rotamase); slyD-Genprodukt von Escherichia coli K12

<400> 1

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
85 90 95

```
Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
            100                 105                 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
        115                 120                 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
    130                 135                 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
145                 150                 155                 160

Asp His Asp His Asp Gly Cys Cys Gly Gly His Gly His Asp His Gly
                165                 170                 175

His Glu His Gly Gly Glu Gly Cys Cys Gly Gly Lys Gly Asn Gly Gly
            180                 185                 190

Cys Gly Cys His
        195
```

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Künstlich

<220>
<223> (GGGS)5-GGG linker sequence

<400> 2

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1               5                   10                  15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
            20
```

<210> 3
<211> 253
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(253)

<223> Prionprotein, Präprotein [Homo sapiens]

<400> 3

```
Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp
1               5                  10                  15

Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
            20                  25                  30

Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
        35                  40                  45

Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
    50                  55                  60

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
65                  70                  75                  80

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His
                85                  90                  95

Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
            100                 105                 110

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
        115                 120                 125

Val Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp
    130                 135                 140

Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val
                165                 170                 175

His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
            180                 185                 190

Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg
        195                 200                 205
```

Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala
210 215 220

Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val
225 230 235 240

Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
245 250

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstlich

<220>
<223> Histidin-tag (His-tag)-Sequenz

<400> 4

Leu Glu His His His His His His
1 5

<210> 5
<211> 1761
<212> DNA
<213>

<220> Künstlich
<223> tandem-EcSlyD und hPrP(23-230)

<400> 5
catatgaaag tagcaaaaga cctggtggtc agcctggcct atcaggtacg tacagaagac 60

ggtgtgttgg ttgatgagtc tccggtgagt gcgccgctgg actacctgca tggtcacggt 120

tccctgatct ctggcctgga aacggcgctg gaaggtcatg aagttggcga caaatttgat 180

gtcgctgttg gcgcgaacga cgcttacggt cagtacgacg aaaacctggt gcaacgtgtt 240

cctaaagacg tatttatggg cgttgatgaa ctgcaggtag gtatgcgttt cctggctgaa 300

accgaccagg gtccggtacc ggttgaaatc actgcggttg aagacgatca cgtcgtggtt 360

gatggtaacc acatgctggc cggtcagaac ctgaaattca acgttgaagt tgtggcgatt 420

cgcgaagcga ctgaagaaga actggctcat ggtcacgttc acggcgcgca cgatcaccac 480

cacgatcacg accacgacgg tggcggttcc ggcggtggct ctggtggcgg aagcggtggc 540

ggttccggcg gtggctctgg tggcggtaaa gtagcaaaag acctggtggt cagcctggcc 600

```
tatcaggtac gtacagaaga cggtgtgttg gttgatgagt ctccggtgag tgcgccgctg    660

gactacctgc atggtcacgg ttccctgatc tctggcctgg aaacggcgct ggaaggtcat    720

gaagttggcg acaaatttga tgtcgctgtt ggcgcgaacg acgcttacgg tcagtacgac    780

gaaaacctgg tgcaacgtgt tcctaaagac gtatttatgg gcgttgatga actgcaggta    840

ggtatgcgtt tcctggctga aaccgaccag ggtccggtac cggttgaaat cactgcggtt    900

gaagacgatc acgtcgtggt tgatggtaac cacatgctgg ccggtcagaa cctgaaattc    960

aacgttgaag ttgtggcgat tcgcgaagcg actgaagaag aactggctca tggtcacgtt   1020

cacggcgcgc acgatcacca ccacgatcac gaccacgacg gtggcggttc cggcggtggc   1080

tctggtggcg gatccggtgg cggttccggc ggtggctctg gtggcggtat gaaaaaacgc   1140

ccaaaaccgg gtggctggaa cactgggggc agccgctatc ctggccaggg ctcgccggga   1200

gggaatcgtt acccaccaca gggtggtggg ggctggggtc agccgcacgg cggcggttgg   1260

gggcaaccgc atggcggcgg atggggtcaa cctcacgggg gaggctgggg ccaaccgcat   1320

ggtggtgggt ggggtcaggg aggcggtacg cattcccaat ggaacaaacc gagtaaaccc   1380

aaaaccaaca tgaagcatat ggcgggtgcc gctgccgcag gtgcagttgt cggtggcctg   1440

ggcggctaca tgttaggaag cgcgatgtca agacccatta tccattttgg ctctgactat   1500

gaagatcgtt actaccgcga gaatatgcac cgttatccga atcaggtgta ttatcgtccg   1560

atggatgaat acagcaacca gaataacttc gtccacgact gtgttaatat taccattaag   1620

cagcatacag tgacgacaac cacgaaaggt gaaaacttta ccgagaccga tgtgaaaatg   1680

atggaacgag tagtagaaca aatgtgcatc actcagtacg aacgcgagag tcaggcgtat   1740

tatcagcggg gctcgctcga g                                             1761
```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung eines Hochdurchsatztests zur Bestimmung des Vorliegens von PrPsc in einer Gewebeprobe, die post mortem aus Gehirn entnommen wurde,
wobei der Test den Arbeitsablauf von (A) Probenherstellung, (B) Probenbehandlung, (C) Probenanalyse, (D) Kontrollen und (E) Klassifizierung der Ergebnisse der Analyse als positiv oder negativ umfasst,
wobei (A) folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen, in einem standardisierten Format, eines Ständers mit einem Satz einzeln beschrifteter Behälter, wobei der Behältersatz eine Untergruppe für Kontrollreaktionen oder Kontrollbehälter, die wie in (D) vorgesehen verarbeitet werden, und eine Untergruppe von Behältern für die Probenanalyse oder Analysebehälter umfasst,
(b) Bereitstellen in jedem Analysebehälter
(i) von 3 bis 6 kugelförmigen Perlen, wobei jede Perle zwischen 50 mg und 100 mg wiegt, und
(ii) eines Volumens an Homogenisierungspuffer, wobei der Homogenisierungspuffer ein proteolytisches Enzym enthält, das in Gegenwart eines chaotropen Mittels eine Proteolyse ausführen kann;
(d) Bereitstellen einer Gewebeprobe aus Gehirn, wobei die Gewebeprobe durch ein Etikett identifiziert wird, das einzigartige Informationen enthält, welche den Ursprung der Gewebeprobe definieren;
(e) Durchführen der Schritte
(i) Aufzeichnen des Etiketts der Gewebeprobe,
(ii) Überführen der Gewebeprobe in einen Analysebehälter,
(iii) Aufzeichnen des Etiketts des Analysebehälters,
(iv) Korrelieren der im Schritt (i) aufgezeichneten Information mit den im Schritt (iii) aufgezeichneten Informationen,
(v) Wiederholen der Schritte (i), (ii), (iii) und (iv), bis die gewünschte Menge an Analysebehältern in dem Stän-

der mit Probengewebe gefüllt ist;
(f) Durchführen der Schritte
(ii) verschließen der Behälter des Ständers mit Verschlussvorrichtungen, gefolgt von
(ii) Schütteln des Ständers mit den Behältern unter Verwendung einer Schüttelvorrichtung, wobei das Schütteln die Perlen vom Boden an die Oberseite jedes Analysebehälters bewegt, wodurch das Probengewebe darin homogenisiert wird, gefolgt von
(iii) Sedimentieren von Gewebetrümmern in den Analysebehältern, gefolgt von
(iv) öffnen der Behälter und Absaugen eines Aliquots des Überstandes aus jedem Behälter,
wobei (B) nach (A) durchgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen einer konditionierten Mikrotiterplatte, wobei jede Vertiefung als Trockensubstanz eine festgelegte Menge eines chaotropen Mittels enthält, wobei das chaotrope Mittel an die Wand der Vertiefung gebunden ist, gefolgt von
(b) Überführen der Überstände von (A) Schritt (f) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, wobei das überführte Volumen derart gewählt wird, dass das Auflösen der Trockensubstanz in jeder Vertiefung zu einer Konzentration zwischen 300 mM und 2 M des chaotropen Mittels im Überstand führt, gefolgt von
(c) Lösen des chaotropen Mittels, gefolgt von
(d) Inkubieren der Mikrotiterplatte bei einer Temperatur zwischen 15°C und 50°C, wodurch die Proteolyse ermöglicht wird, gefolgt von
(e) Inhibieren der Aktivität des proteolytischen Enzyms, gefolgt von
(f) Erhöhen der Konzentration des chaotropen Mittels in dem Gemisch in jeder Vertiefung auf einen Wert zwischen 3,5 M und 5 M, gefolgt von
(g) Inkubieren der Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln bei Raumtemperatur, wobei die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden, wodurch behandelte Proben bereitgestellt werden,
wobei (C) nach (B) durchgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen einer Nachweis-Mikrotiterplatte, die mit Streptavidin beschichtet ist,
(b) Überführen eines Aliquots von jeder behandelten Probe von (B) Schritt (f) in eine Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, gefolgt von
(c) Zugeben eines drei- bis zehnfachen Volumens einer Nachweislösung zu dem Aliquot, die ein erstes und zweites Bindungsmittel enthält, das für zwei getrennte Epitope von entfaltetem PrP(27–30) spezifisch ist, wobei das erste spezifische Bindungsmittel biotinyliert ist und das zweite spezifische Bindungsmittel mit einem Reporterenzym konjugiert ist, gefolgt von
(d) Inkubieren der Nachweis-Mikrotiterplatte unter stetigem Schütteln, wodurch die Komponenten in den Vertiefungen gemischt werden und man Komplexe aus den spezifischen Bindungsmitteln und entfaltetem PrP(27–30) bilden lässt, gefolgt von
(e) Entfernen der Flüssigkeit aus den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Waschen der Vertiefungen mit Waschpuffer, gefolgt von
(f) Zugeben von Reporterenzym-Substratlösung zu den Vertiefungen der Nachweis-Mikrotiterplatte und Inkubieren der Platte, gefolgt von
(g) Durchführen der Schritte
(i) Messen des Umsatzes des Substrates in einer Vertiefung als optische Dichte (OD), wodurch ein Messwert für die Vertiefung bereitgestellt wird, gefolgt von
(ii) Aufzeichnen des Messwerts, wobei eine Überablesung als OD = 4,0 aufgezeichnet wird,
(iii) Korrelieren des aufgezeichneten Messwerts von (ii) mit den Informationen, die für die entsprechende Gewebeprobe in (A) Schritt (e) Schritt (i) aufgezeichnet wurden,
(iv) Wiederholen der Schritte (i) bis (iii), bis die Messwerte im Hinblick auf alle Gewebeproben verarbeitet worden sind, wodurch Analysedaten in Bezug auf die Proben erhalten werden,
wobei (D) folgende Schritte umfasst
(a) Bereitstellen eines Reagens, das ein rekombinant hergestelltes, lösliches Fusionsprotein enthält, das die Aminosäuresequenzen von (i) einem oder mehreren löslichen Trägerpolypeptiden, (ii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das erste spezifische Bindungsmittel abzielt, und (iii) einem oder mehreren Epitopen von PrP(27–30), auf die das zweite spezifische Bindungsmittel abzielt, umfasst,
(b) vor der Durchführung der Schritte (A) Schritt
(f) und des anschließenden Arbeitsablaufs Durchführen der folgenden Schritte
(i) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer ersten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von
(ii) Bereitstellen eines Aliquots des Homogenisierungspuffers von (A) Schritt (b) Schritt (i) in der ersten Menge an Kontrollbehältern, wodurch negative Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(iii) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (i) mit den negativen Kontrollen,
(iv) Aufzeichnen der Informationen der Etiketten einer zweiten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a), gefolgt von

(v) Bereitstellen, in der zweiten Menge an Kontrollbehältern, eines Aliquots einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Homogenisierungspuffer ohne das proteolytische Enzym und Homogenisierungspuffer, der zusätzlich eine wirksame Menge eines Proteaseinhibitors enthält, wodurch positive Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(vi) Korrelieren der aufgezeichneten Informationen von (iv) mit den positiven Kontrollen, gefolgt von
(vii) Abgeben einer abgemessenen Menge an Kontrollreagens in jeden Kontrollbehälter,
(viii) Einschließen der positiven und negativen Kontrollen in (A) Schritt (f) , (B) und (C) Schritte (a) bis (f),
(c) Durchführen der folgenden Schritte
(i) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine negative Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle negativen Kontrollen verarbeitet worden sind,
(ii) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (i) mit den für die negativen Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch negative Kontrolldaten erhalten werden,
(iii) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine positive Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle positiven Kontrollen verarbeitet worden sind,
(iv) Korrelieren der aufgezeichneten Messwerte von (iii) mit den für die positiven Kontrollen aufgezeichneten Informationen, wodurch positive Kontrolldaten erhalten werden,
wobei (E) nach (A), (B), (C) und (D) durchgeführt werden muss und folgende Schritte umfasst
(a) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der positiven Kontrolldaten [M(p)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,
(b) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der negativen Kontrolldaten [M(n)], die von (D) Schritt (c) geliefert werden,
(c) Berechnen des Mittelwerts der Messwerte der Analysedaten [M(a)], die von (C) Schritt (d) geliefert werden,
(d) Berechnen eines Ausschlusswerts,
(e) Vergleichen des Messwerts einer Gewebeprobe, der von (C) Schritt (d) geliefert wird, mit dem Ausschlusswert von (d), gefolgt von
(f) Durchführen der Schritte
(i) Klassifizieren des Messwerts als positives Testergebnis, wenn der Messwert gleich oder größer als der Ausschlusswert ist, oder
(ii) Klassifizieren des Messwerts als negatives Testergebnis, wenn der Messwert kleiner als der Ausschlusswert ist, gefolgt von
(iii) Aufzeichnen des Testergebnisses und Korrelieren des Testergebnisses mit der Information, die für die entsprechende Gewebeprobe aufgezeichnet wurde, gefolgt von
(iv) Zuweisen des Testergebnisses zu der entsprechenden Gewebeprobe,
(g) Wiederholen der Schritte (e) und (f), bis die Messwerte aller Gewebeproben verarbeitet sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl an erwarteten negativen Proben höher ist als die Anzahl an erwarteten positiven Proben ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass
(A) zusätzlich die Bereitstellung eines Computers umfasst, der mit einer Einlesevorrichtung, einer Datenbank, Datenbank-Management-Software, Proben-Nachverfolgungssoftware und einer Datenausgabevorrichtung ausgestattet ist, und
(A) Schritt (e) die Durchführung folgender Schritte umfasst
(i) Einlesen des Etiketts der Gewebeprobe in den Computer und Speichern der Informationen des Etiketts in der Datenbank,
(ii) Überführen der Gewebeprobe in einen Analysebehälter,
(iii) Einlesen des Etiketts des Analysebehälters in den Computer und Speichern der Informationen des Etiketts in der Datenbank,
(iv) Korrelieren der gespeicherten Informationen von Schritt (i) mit der gespeicherten Information von Schritt (iii),
(v) Wiederholen der Schritte (i), (ii), (iii) und (iv), bis die gewünschte Menge an Analysebehältern in dem Ständer mit Probengewebe gefüllt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass in (B) die Mikrotiterplatte von Schritt (a) beschriftet wird und vor der Durchführung von Schritt (b) das Etikett der Mikrotiterplatte in den Computer eingelesen und die Informationen des Etiketts in der Datenbank gespeichert werden. Die gespeicherten Informationen des Plattenetiketts werden mit den gespeicherten Informationen des Ständers korreliert, der die Behälter hält, aus denen der Überstand in die Vertiefungen der Platte überführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass

(C) Schritt (g) die Durchführung folgender Schritte umfasst
(i) Messen des Umsatzes des Substrates in einer Vertiefung als optische Dichte (OD), wodurch ein Messwert für die Vertiefung bereitgestellt wird, gefolgt von
(ii) Einlesen des Messwerts in den Computer, wobei eine Überablesung als CD = 4,0 eingestellt wird,
(iii) Speichern des Messwerts in der Datenbank,
(iv) Korrelieren des gespeicherten Messwerts von (ii) mit den Informationen, die für die entsprechende Gewebeprobe gespeichert wurden,
(v) Wiederholen der Schritte (i) bis (iv), bis die Messwerte im Hinblick auf alle Gewebeproben verarbeitet worden sind, wodurch Analysedaten in Bezug auf die Proben erhalten werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass
(D) Schritt (b)
vor der Durchführung der Schritte (A) Schritt (f) und der folgenden Schritte die Durchführung der folgenden Schritte umfasst
(i) Einlesen der Informationen auf den Etiketten einer ersten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a) in den Computer und Speichern der Informationen des jeweiligen Etiketts in der Datenbank, gefolgt von
(ii) Bereitstellen eines Aliquots an Homogenisierungspuffer in der ersten Menge an Kontrollbehältern, wodurch negative Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(iii) Korrelieren der gespeicherten Informationen von (i) mit den negativen Kontrollen,
(iv) Einlesen der Informationen der Etiketten einer zweiten Menge an Kontrollbehältern von (A) Schritt (a) in den Computer und Speichern der Informationen des jeweiligen Etiketts in der Datenbank, gefolgt von
(v) Bereitstellen, in der zweiten Menge an Kontrollbehältern, eines Aliquots an Homogenisierungspuffer ohne das proteolytische Enzym, wodurch positive Kontrollen bereitgestellt werden, gefolgt von
(vi) Korrelieren der gespeicherten Informationen von (iv) mit den positiven Kontrollen, gefolgt von
(vii) Abgeben einer abgemessenen Menge an Kontrollreagens in jeden Kontrollbehälter.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass
(D) Schritt (c) die Durchführung folgender Schritte umfasst
(i) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine negative Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle negativen Kontrollen verarbeitet worden sind, gefolgt von
(ii) Korrelieren der gespeicherten Messwerte von (i) mit den für die negativen Kontrollen gespeicherten Informationen, wodurch negative Kontrolldaten bereitgestellt werden,
(iii) Wiederholen von (C) Schritt (g) Schritte (i) bis (iii) für jede Vertiefung der Nachweis-Mikrotiterplatte, die eine positive Kontrolle enthält, bis die Messwerte in Bezug auf alle positiven Kontrollen verarbeitet worden sind, gefolgt von
(iv) Korrelieren der gespeicherten Messwerte von (iii) mit den für die positiven Kontrollen gespeicherten Informationen, wodurch positive Kontrolldaten bereitgestellt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) zusätzlich die Durchführung eines ersten Validitätstests nach Schritt (c) und vor Schritt (d) umfasst und mit Schritt (d) fortfährt unter der Voraussetzung, dass jedes von (i) bis (iv) gilt:
(i) M(p) größer als 1,2 ist,
(ii) nicht mehr als 25% der Messwerte der positiven Kontrollen von M(p) um mehr als 20% abweichen,
(iii) M(n) kleiner als 0,2 ist,
(iv) nicht mehr als 25% der Messwerte der negativen Kontrollen von M(n) um mehr als 20% abweichen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) Schritt (d) das Berechnen des Ausschlusswerts "c1" gemäß Formel I umfasst

$$c1 = a \times M(n) + b \qquad (I),$$

wobei "a" ein Wert zwischen 0,2 und 1 einschließlich 0,2 und 1 ist und "b" ein Wert zwischen 0,05 und 0,5 einschließlich 0,05 und 0,5 ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) Schritt (d) zusätzlich das Berechnen eines Validitätsindexes "v1" gemäß Formel II

$$v1 = c1 + M(a) \qquad (II)$$

und das Fortfahren mit den Schritten (e) bis (g) unter der Voraussetzung umfasst, dass der Wert von "v1" zwischen 1,5 und 7 einschließlich 1,5 und 7 ist.

11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) Schritt (d) das Berechnen des Ausschlusswerts "c2" gemäß Formel III umfasst

$$c2 = y \times M(n) + z \times M(p) \quad \text{(III)},$$

wobei "y" ein Wert zwischen 1 und 1,5 einschließlich 1 und 1,5 ist und "z" ein Wert zwischen 0,05 und 0,15 einschließlich 0,05 und 0,15 ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) Schritt (d) zusätzlich das Berechnen eines Validitätsindexes "v2" gemäß Formel IV und eines Validitätsindexes "v3" gemäß Formel V

$$v2 = M(n)/M(p) \quad \text{(IV)}$$

$$v3 = M(a)/M(p) \quad \text{(V)}$$

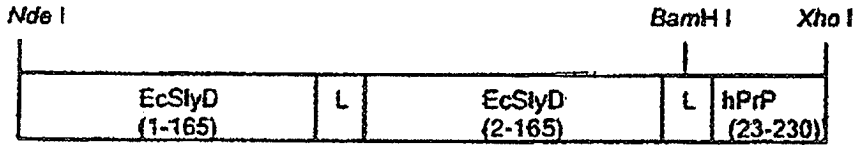
und das Fortfahren mit den Schritten (e) bis (g) unter der Voraussetzung umfasst, dass der Wert von "v2" kleiner als 0,075 ist, wobei 0,075 nicht eingeschlossen ist, und der Wert von "v3" kleiner als 0,1 ist, wobei 0,1 nicht eingeschlossen ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass
(E) Schritt (f) die Durchführung folgender Schritte umfasst
(i) Klassifizieren des Messwerts als positives Testergebnis, wenn der Messwert gleich oder größer als der Ausschlusswert ist, oder
(ii) Klassifizieren des Messwerts als negatives Testergebnis, wenn der Messwert kleiner als der Ausschlusswert ist, gefolgt von
(iii) Speichern des Testergebnisses in der Datenbank und Korrelieren des Testergebnisses mit den Informationen, die für die entsprechende Gewebeprobe gespeichert wurden, gefolgt von
(iv) Zuweisen des Testergebnisses zu der entsprechenden Gewebeprobe und Erzeugen einer Ausgabe, die das Testergebnis und die Informationen über die Gewebeprobe enthält.

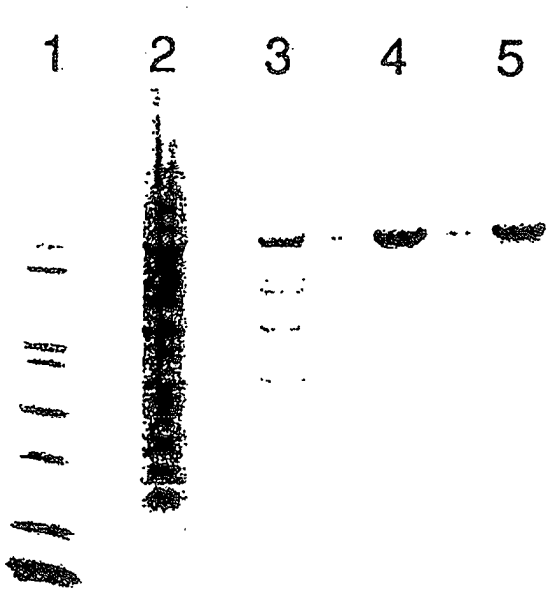
Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

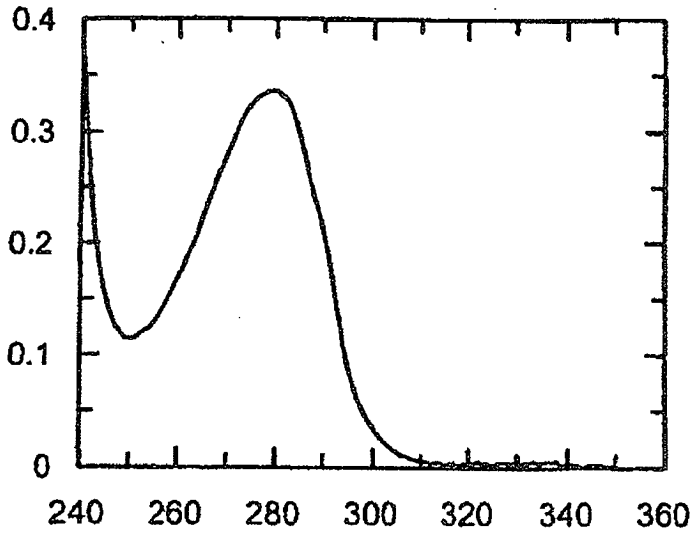
Figur 1



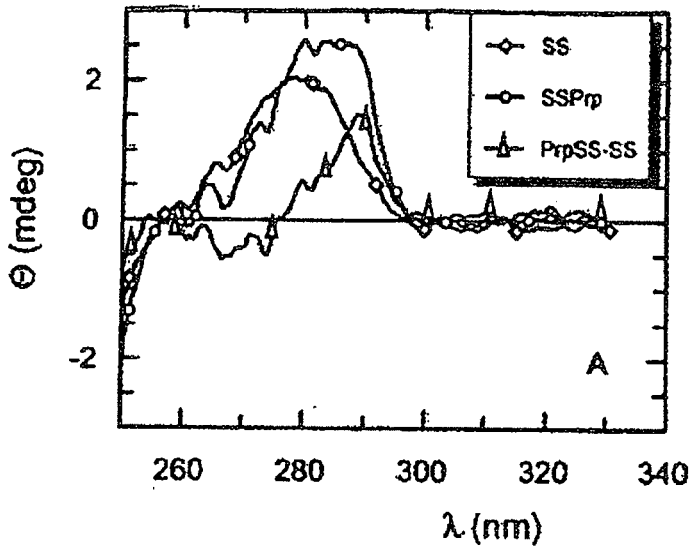
Figur 2

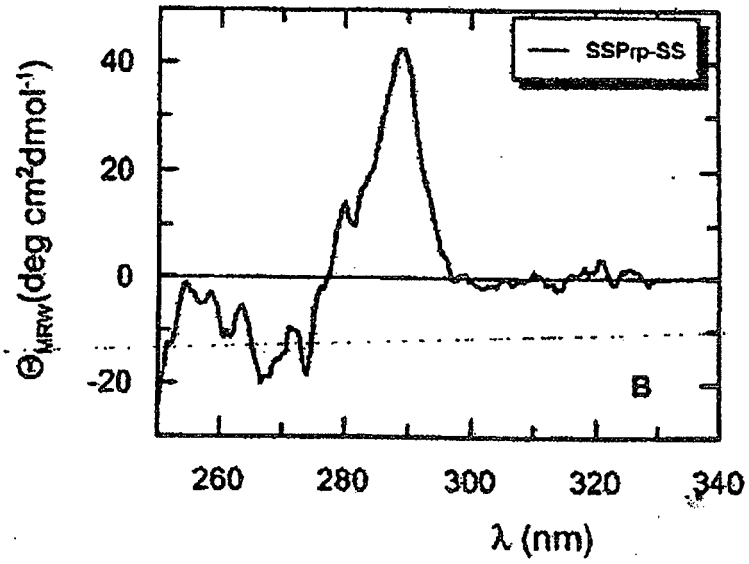


Figur 3



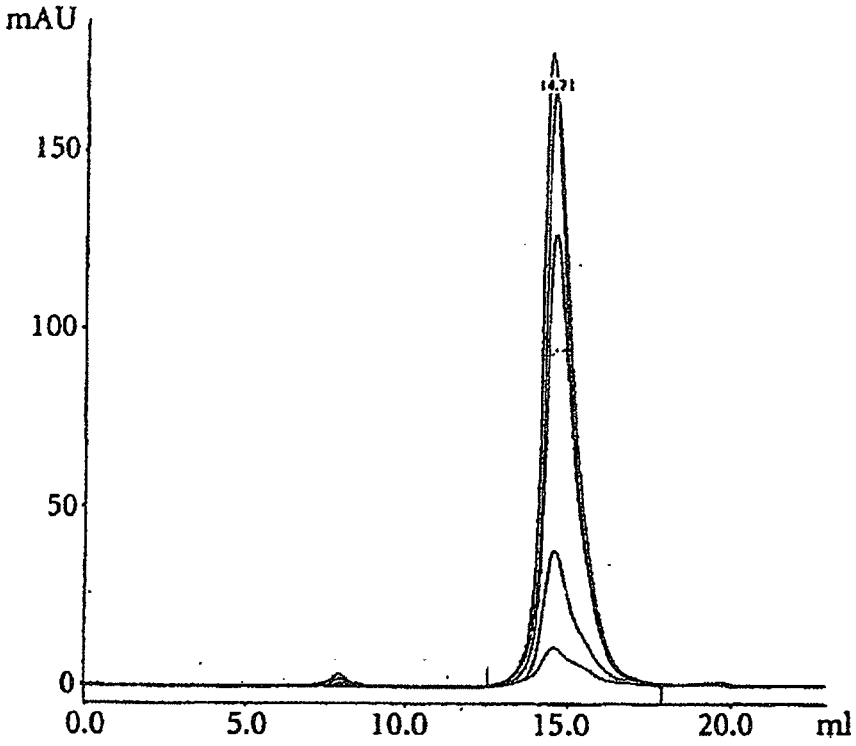
Figur 4


SS
SSPrp
PrpSS-SS
2
0
-2
Θ (mdeg)
A
260
280
300
320
340
λ (nm)

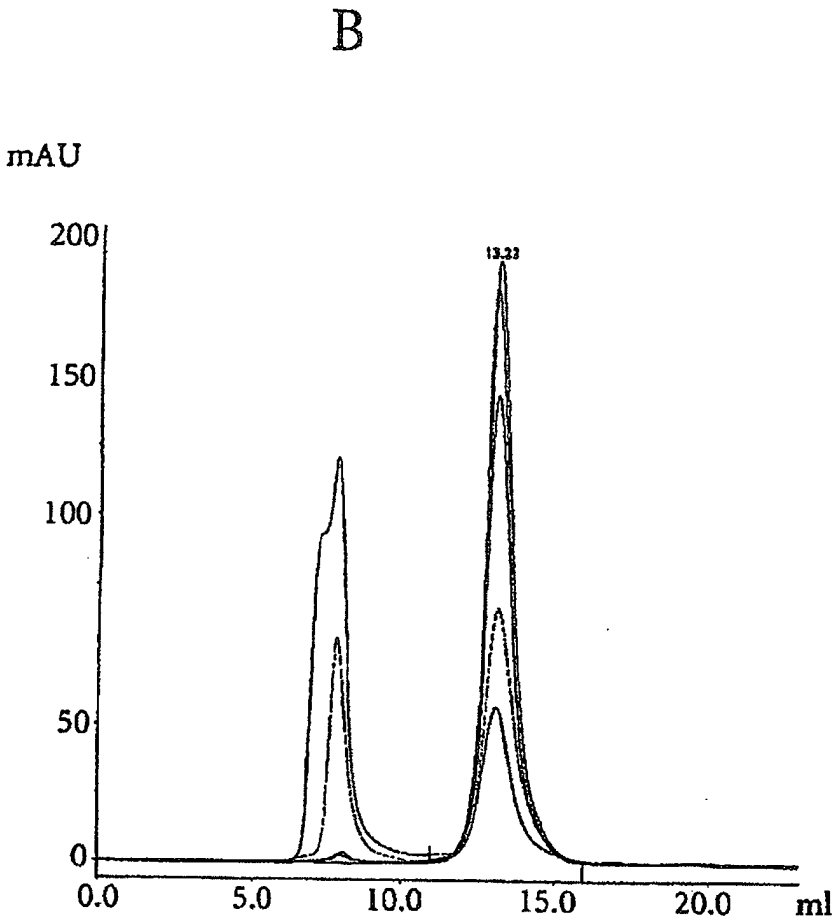

SSPrp-SS
40
20
0
-20
Θ_{MRW}(deg cm^{2}dmol^{-1})
B
260
280
300
320
340
λ (nm)

Figur 5

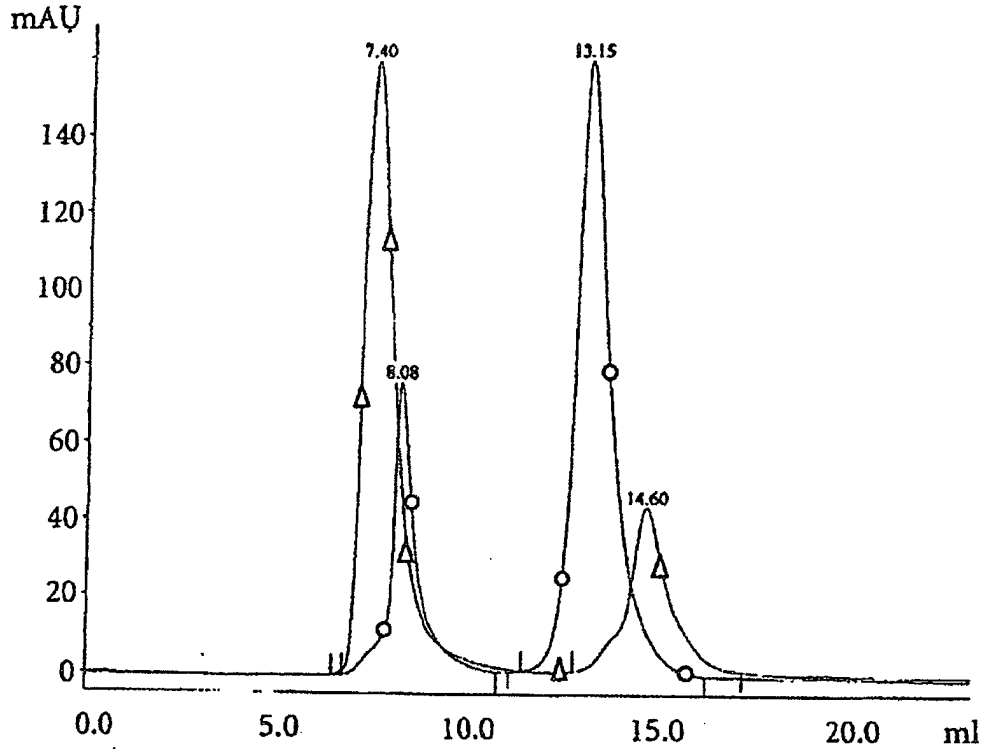
A

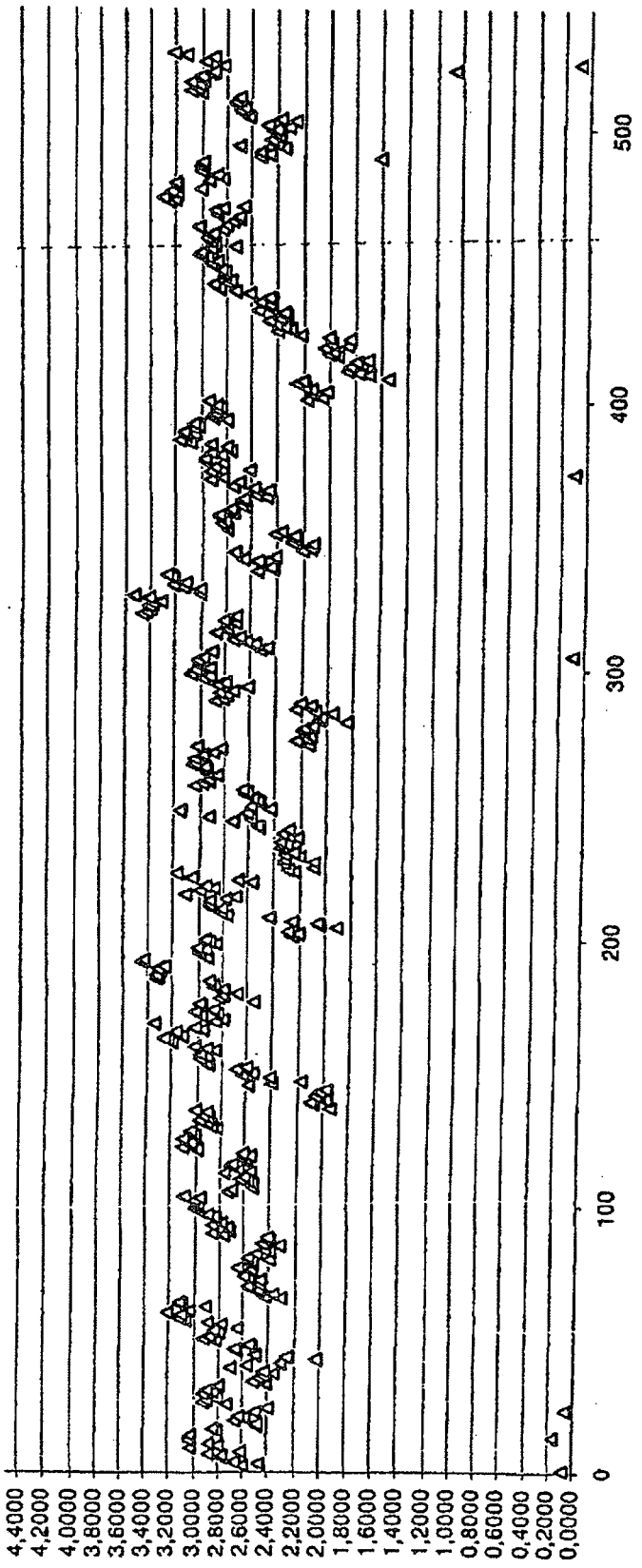


Figur 5

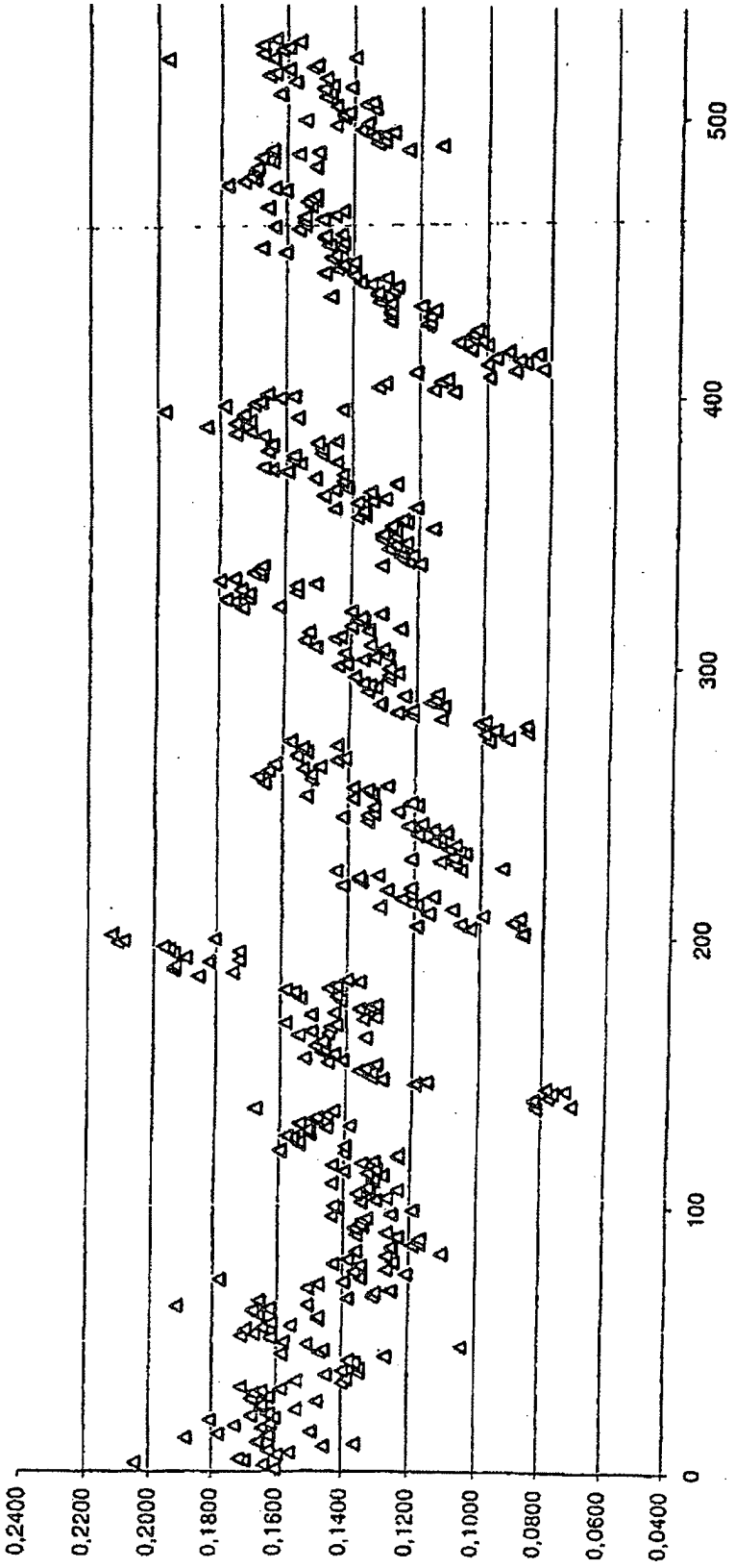


Figur 6

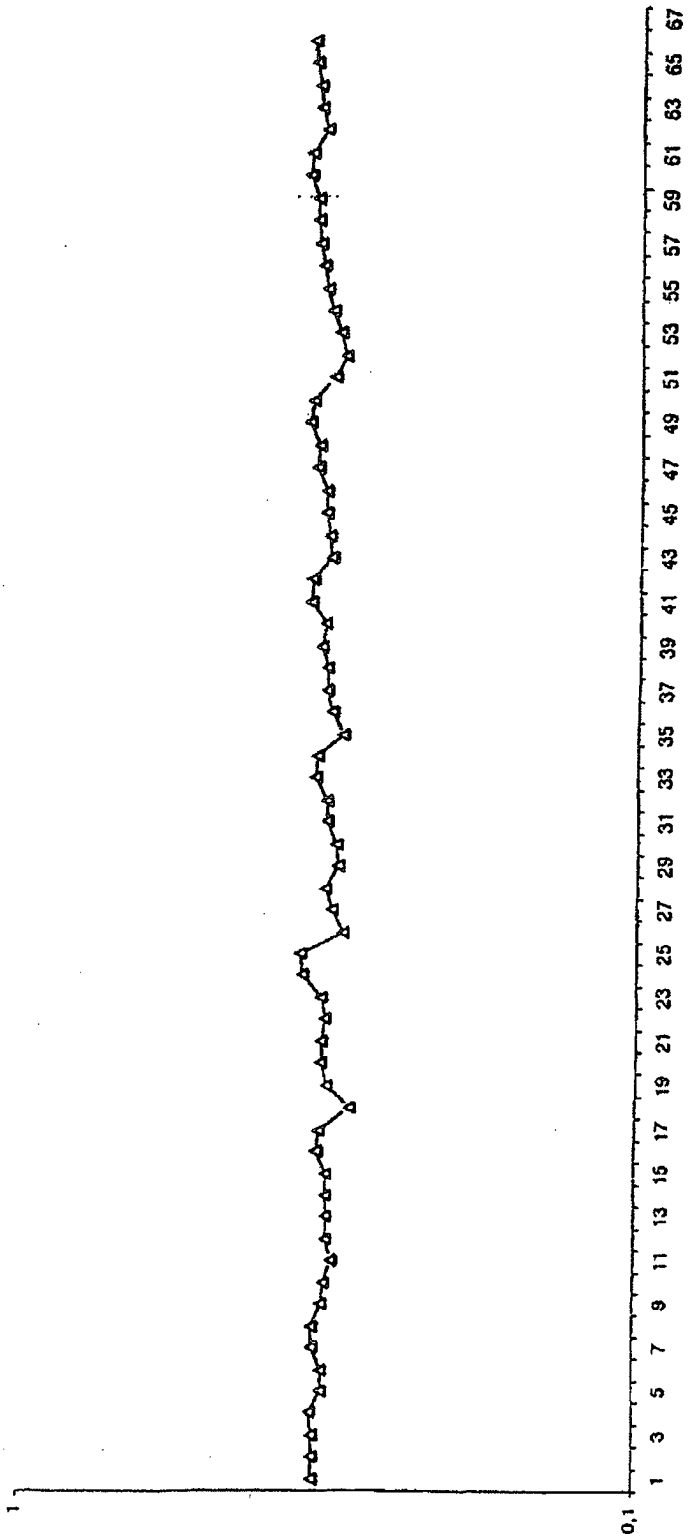

mAU
140
120
100
80
60
40
20
0
7.40
8.08
13.15
14.60
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
ml


4,4000
4,2000
4,0000
3,8000
3,6000
3,4000
3,2000
3,0000
2,8000
2,6000
2,4000
2,2000
2,0000
1,8000
1,6000
1,4000
1,2000
1,0000
0,8000
0,6000
0,4000
0,2000
0,0000
0
100
200
300
400
500

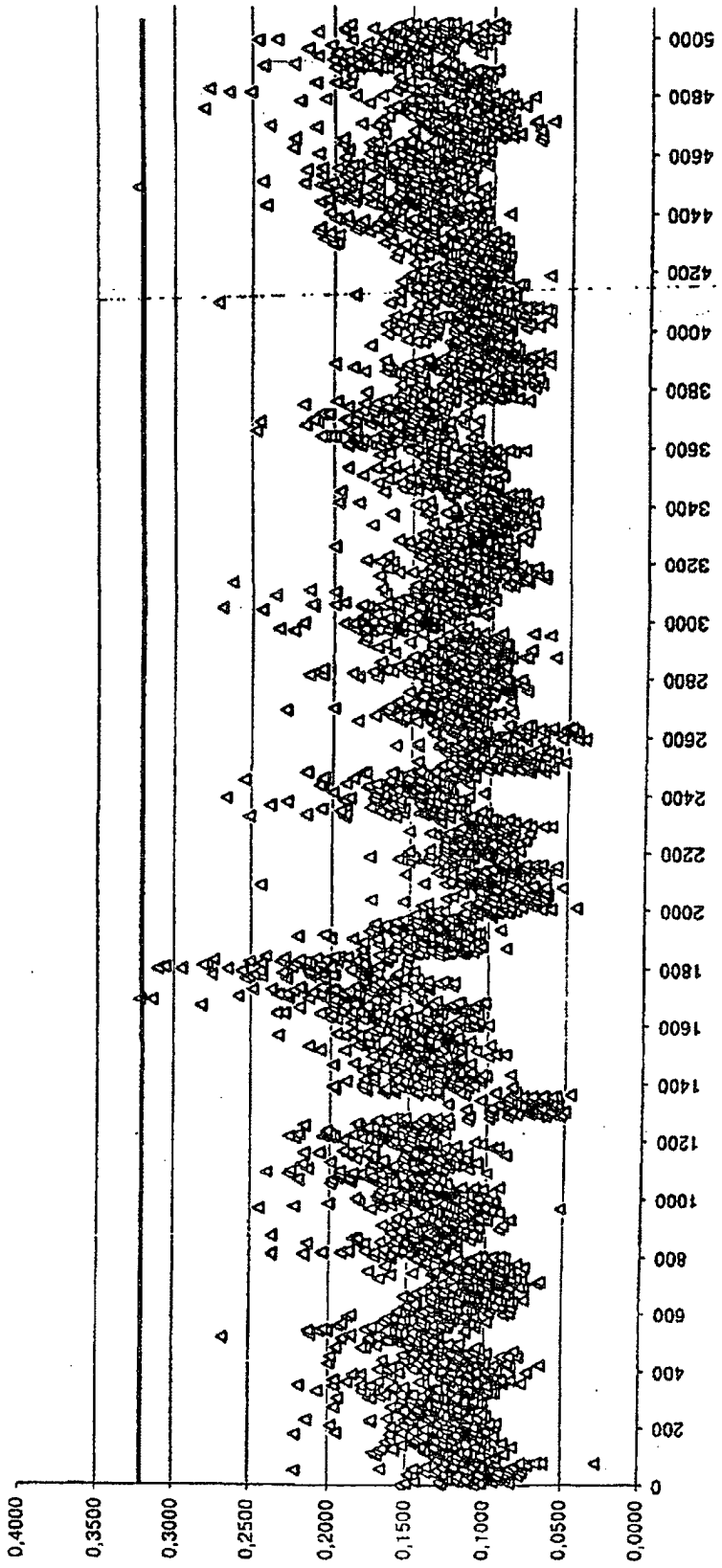
Figur 7


0,2400
0,2200
0,2000
0,1800
0,1600
0,1400
0,1200
0,1000
0,0800
0,0600
0,0400
0
100
200
300
400
500

Figur 8

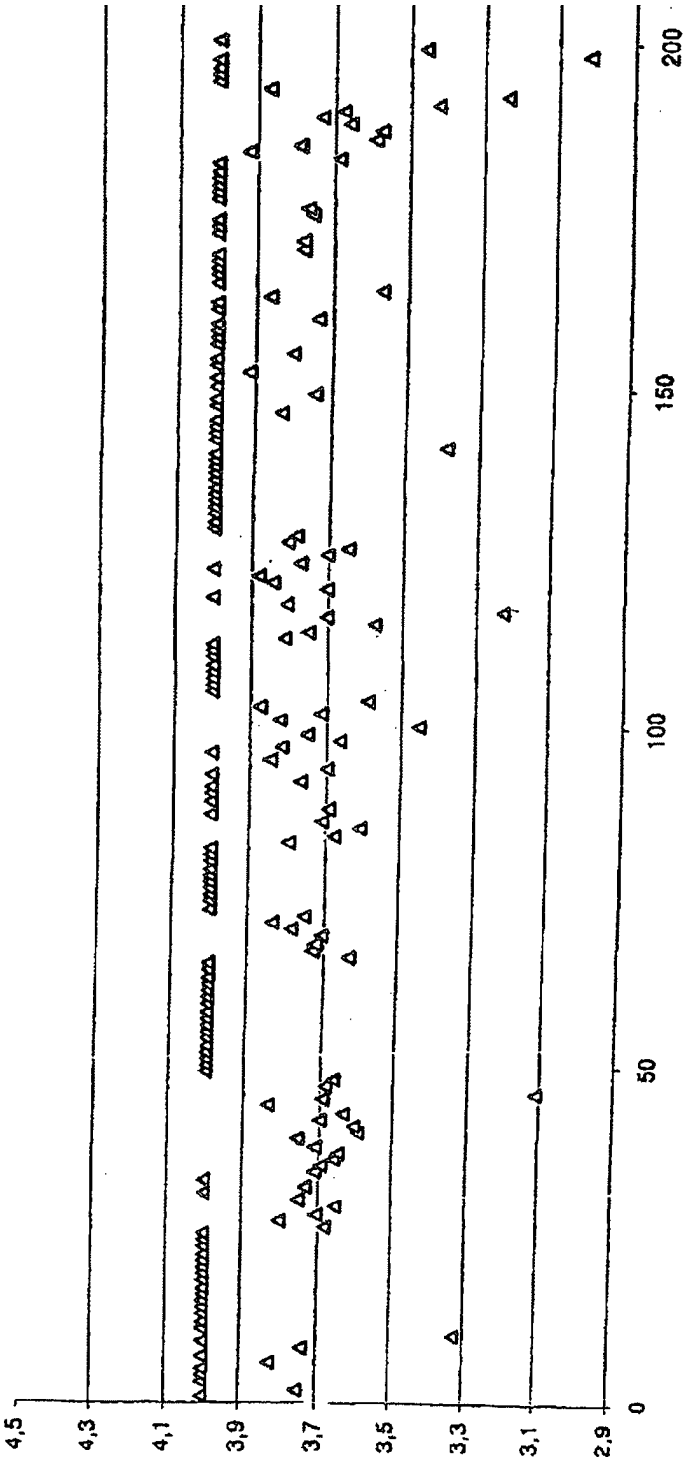

1
0,1
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67

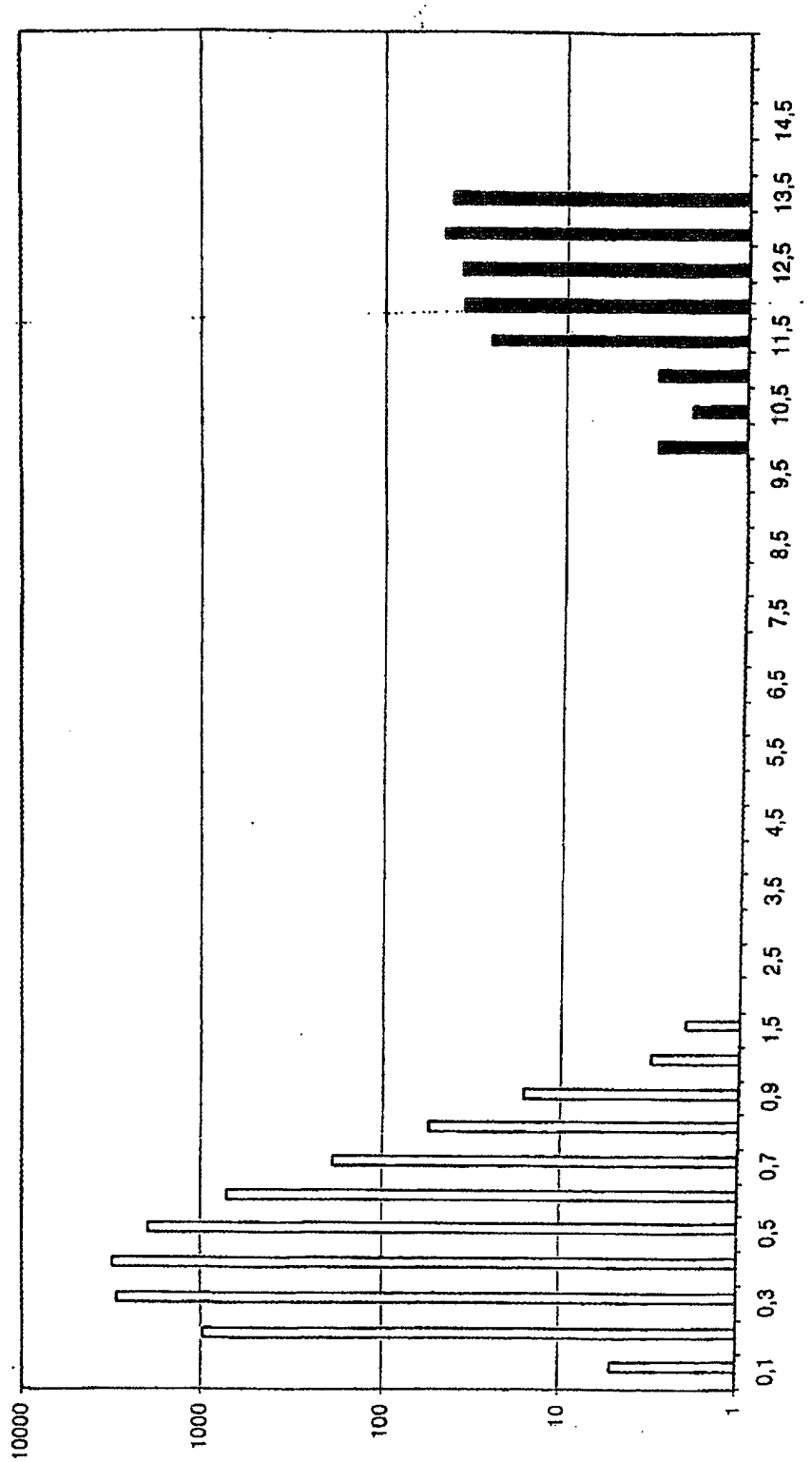
Figur 9


0,4000
0,3500
0,3000
0,2500
0,2000
0,1500
0,1000
0,0500
0,0000
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
2600
2800
3000
3200
3400
3600
3800
4000
4200
4400
4600
4800
5000

Figur 10

Figur 11




10000
1000
100
10
1
0,1
0,3
0,5
0,7
0,9
1,5
2,5
3,5
4,5
5,5
6,5
7,5
8,5
9,5
10,5
11,5
12,5
13,5
14,5

Figur 12